

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

FAKULTA TEXTILNÍ

Studium inkorporace fibroblastů do nanovláknenných vrstev

Study of incorporation of fibroblasts into nanofibrous layers

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: Ing. Petr Mikeš, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Mgr. Jana Horáková

Autor práce: Marcela Cudlínová

2013

Originál zadání práce

1. Vypracování rešerše na dané téma.
2. Studium možností inkorporace fibroblastů do nanovláknenných vrstev pomocí electrospinningu.
3. Studium mortality/vitality inkorporovaných fibroblastů.
4. Vyhodnocení výsledků.

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce a konzultantem.

Datum

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce Ing. Petru Mikešovi, Ph.D. za odborné rady při vedení práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Horákové za ochotu a čas strávený při konzultacích.

Poděkování patří také Centralizovanému rozvojovému projektu č. 12091 s názvem *Integrovaný systém vzdělávání v tkáňovém inženýrství, regenerativní medicíně a nanobiotechnologiích na UK, ČVUT a TUL*.

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá metodami inkorporace fibroblastů do nanovláknenných vrstev a studiem jejich vitality v závislosti na použité metodě. Fibroblasty jsou základní buňky vazivových tkání, které lze snadno kultivovat v laboratorním prostředí. Práce je motivována rozvojem v oblasti tkáňového inženýrství, které klade vysoké nároky na přípravu kvalitních tkáňových nosičů. Nanovláknenné struktury, jejichž typickou vlastností je velký měrný povrch vláken a dobrá buněčná adheze, se již v minulosti osvědčily jako vhodné tkáňové nosiče. Osidlování buňkami z vnějšího povrchu nezajišťuje rovnoměrné rozmístění buněk uvnitř nosiče. Cílem této práce je osídlení vláknenného nosiče v jeho celém objemu, což je důležité pro vývoj trojrozměrných struktur určených pro tkáňové inženýrství. Součástí práce je také studium proliferace fibroblastů do nanovláknenných struktur za použití růstových faktorů produkovaných krevními destičkami.

Klíčová slova: tkáňové inženýrství, buněčný nosič, elektrostatické zvlákňování, fibroblast, trombocyty.

Abstract

The thesis aims to development of methods of fibroblast incorporation into nano fiber structures. Cells viability is then studied with regards to the method of incorporation. Fibroblasts are considered to be fundamental connective cells in animals. Handling and culturing of this kind of cells is feasible in laboratory environment. The work is motivated with recent development in tissue engineering, which places high demands on preparation of a scaffold. Nano fibrous structures, featuring large specific surface area and great adhesion of cells, have shown to be suitable materials for scaffolds preparation. Recent development in this area concerned seeding cells onto a surface of fibrous structure. Such method leads to unequal displacement of cells among entire mass of fibrous structure. This diploma thesis concerns development of methods through which cells are seeded in the entire volume, and thus enable preparation of three dimensional scaffolds. Penetration of cells into the structure has been stimulated with growth factors produced by thrombocytes. The effect of growth factor addition on cells penetration has also been studied.

Keywords: tissue engineering, scaffold, electrospinning, fibroblast, platelet.

Obsah

Seznam použitých symbolů	8
Seznam odborných termínů	8
1. ÚVOD	10
2. Teoretická část	11
2.1 Motivace k řešení diplomové práce	11
2.2 Základní principy tkáňového inženýrství	13
2.2.1 Buněčné nosiče	13
2.2.2 Struktura buněčného nosiče	15
2.2.3 Osidlování buněčných nosičů	16
2.3 Nanovláknenné struktury	16
2.3.1 Elektrostatické zvlákňování	17
2.4 Buněčné kultury	18
2.4.1 Izolace buněk	19
2.4.2 Kultivační podmínky a média	19
2.4.3 Fibroblasty	20
2.4.4 Růstové faktory	21
2.4.5 Trombocyty	22
3. Materiál a metody	24
3.1 Polykaprolakton	24
3.1 Použitá kultivační média	25
3.2 Pasážování buněk	25
3.3 Přímé stanovení viability buněk	27
3.4 Vyhodnocování viability buněk – MTT test	27
3.5 Fixace buněk	29
3.6 Mikroskopie	29

4.	Experimentální část.....	30
4.1	Inkorporace fibroblastů do nanovláknenných vrstev	30
4.1.1	Vyhodnocení metod	33
4.1.2	Vliv použitých metod na viabilitu fibroblastů	38
4.1.3	Struktura vyrobených vrstev	39
4.2	Inkorporace trombocytů do nanovláknenných vrstev	41
4.2.1	Vyhodnocení metody	42
4.2.2	Struktura vyrobených vrstev	47
5.	Diskuze výsledků.....	49
6.	Závěr	51
7.	Literatura.....	52

Seznam použitých symbolů

ATP	- Adenosine triphosphate (= adenosintrifosfát)
ECM	- Extracellular matrix (= mezibuněčná hmota)
MTT	- Methyltetrazoliová sůl
NHDF	- Normal Human Dermal Fibroblasts (= lidské kožní fibroblasty)
PBS	- Phosphate Buffered Saline (= fosfátový pufr)
PCL	- Polykaprolakton
PRP	- Platelet Rich Plasma (= plasma bohatá na krevní destičky)
PVA	- Polyvinylalkohol
TRS	- Thrombocyte rich solution

Seznam odborných termínů

Adenosintrifosfát – nukleoid důležitý pro funkci všech známých buněk. Při jeho rozkladu dochází k uvolnění značného množství energie, která je využívána téměř ve všech typech buněčných pochodů.

Apoptóza - programovaný zánik buňky.

Buněčná migrace – aktivní pohyb buněk v rámci mnohobuněčného těla.

Buněčná proliferace - hojné množení, bujení, novotvoření skupiny buněk.

Diferenciace - funkční a tvarové vyzrávání buňky.

Genová exprese - projevení genetické informace ve vzhledu a činnosti buňky a organismu.

Hemokoagulace - krevní srážení.

Histogeneze - proces vzniku a vývoje tkání v průběhu vývoje jedince. Je důsledkem determinace a diferenciace buněk.

Hydrofobie - vodu nesnášející molekuly nebo povrchy neinteragující s vodou

In vitro – z latiny „ve skle“ tj. ve zkumavce, za umělých laboratorních podmínek.

In vivo - z latiny „v živém“, v živém organismu (lidském nebo zvířecím).

Kolagenáza - enzym štěpící kolagen.

Mezenchym - embryonální "pojivová tkáň", která vyplňuje štěrby mezi zárodečnými listy, od nichž se odlišuje řdkou až síťovitou texturou.

Tkáň - základní stavební složka orgánů lidského těla.

Tropokolagen – prekurzor kolagenu.

Viabilita - životaschopnost, schopnost přežití, funkčnost a výkonnost.

1. ÚVOD

V současné době je zaznamenán velký rozvoj tkáňového inženýrství, které se zabývá problematikou výroby biologických náhrad k obnově či zlepšení funkcí tkání. Pro rozvoj tkáňového inženýrství je nutné vyvíjet buněčné nosiče tzv. scaffoldy, které slouží jako podpůrné konstrukce pro růst buněk. Vzhledem k velikosti buněk se pro výrobu scaffoldů osvědčila nanovláknna, jejichž nespornou výhodou jsou průměry v nanometrech a velký měrný povrch vláken.

Určitý problém představuje osidlování buněčného nosiče buňkami, které převážně probíhá pouze z povrchu nosiče. Buňky pronikají do celého objemu buněčného nosiče obtížně a jejich rozmístění je velmi nehomogenní.

Cílem této diplomové práce je inkorporace fibroblastů do celého objemu nanovláknenného buněčného nosiče. Jedna z možností inkorporace je přidávání fibroblastů přímo do procesu elektrostatického zvlákňování.

Další cestou, jak zvýšit proliferaci fibroblastů do nanovláknenných struktur, je použití růstových faktorů, které zvyšují buněčnou proliferaci. Růstové faktory jsou obsaženy např. v trombocytech. Homogenní inkorporací trombocytů do nanovláknenných struktur by mohlo mít za následek proliferaci fibroblastů do celého objemu buněčného nosiče.

Diplomová práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část.

Motivace k řešení diplomové práce a literární rešerše je zpracována v teoretické části práce. Dále tato kapitola obsahuje poznatky o buněčných nosičích a výrobě nanovláknenných struktur metodou elektrostatického zvlákňování. V neposlední řadě se zabývá fibroblasty, tedy buňkami, které byly použity v experimentální části práce.

V praktické části práce jsou popsány materiály a metody použité při experimentech. Kapitola je zaměřena na metody inkorporace buněk do buněčných nosičů vyráběných metodou elektrostatického zvlákňování.

Závěr představuje shrnutí všech získaných výsledků.

2. Teoretická část

První část této kapitoly se zabývá motivací k řešení diplomové práce a literární rešerší vědeckých článků týkajících se inkorporace buněk do nanovláknenných struktur. Dále je v kapitole přiblížena problematika tkáňového inženýrství, výroby buněčných nosičů a nanovláknenných struktur. Součástí této kapitoly jsou poznatky o buněčných kulturách a jejich získávání. Blíže jsou popsány fibroblasty, jakožto buňky využívané v experimentální části pro zjišťování proliferace do nanovláknenných vrstev. Růstové faktory použité ke zvýšení proliferace fibroblastů v experimentální části, jsou popsány v závěru teoretické části.

2.1 Motivace k řešení diplomové práce

Výzkum a vývoj v oblasti tkáňového inženýrství je zaměřen na výrobu trojrozměrných struktur pro následné osídlení specifickým typem buněk. V případě, že jsou tyto struktury (buněčné nosiče) osidlovány buňkami pouze z povrchu, proliferace buněk do celého objemu nosiče je komplikovaná a rozmístění buněk je nehomogenní.

Tato diplomová práce částečně navazuje na bakalářskou práci s názvem Vývoj a biologické testování nanovláknenných vrstev [1]. Cílem této bakalářské práce bylo pomocí elektrostatického zvláknování vyrobit nanovláknennou vrstvu, která by sloužila jako podpůrná konstrukce pro růst buněk a simulovala by náhradu poškozené tkáně. Modelovými jednobuněčnými organismy pro biologické testování byly pivovarské kvasinky.

Metoda inkorporace kvasinek do nanovláknenné vrstvy pomocí elektrostatického zvláknování vodného roztoku polyvinylalkoholu (PVA) s přimíchanými buňkami prokázala, že lze kvasinky vnést přímo do nanovláken, nebo do nanovláknenné vrstvy. Vyhodnocením této metody bylo zjištěno, že procento zvlákněných a přeživších kvasničných buněk bylo pouze 0,05 %. Metodou inkorporace buněk přímo do nanovláknenné vrstvy by však mohly být buňky vneseny a kultivovány přímo v celém objemu vytvořené struktury.

První report o zvláknování buněk z roku 2008 (Van Aalst, 2008) pochází ze severní Karolíny [2]. Princip experimentu spočíval v elektrostatickém zvláknování 10 hm% PVA s přimíchanými buňkami – v tomto případě fibroblasty a tukovými buňkami. Viabilita buněk byla sledována v několika částech experimentu (vliv polymeru, napětí,

mechanické napětí při průchodu buněk aparaturou). Snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu prokázaly inkorporaci buněk přímo do nanovláken. Testy viability buněk v různých částech experimentu neprokázaly výrazný rozdíl mezi zvlákněnými buňkami a buňkami, které tímto procesem neprošly. Autoři tohoto článku doporučili pro další experimenty použít biodegradabilní, ve vodě nerozpustný polymer. Dále uvádějí poznatek, že buňky jsou mnohem větší než nanovlákná, ve kterých jsou sevřeny. Omezený pohyb buněk a nedostatečná difuze živin a odpadních produktů v takto vyrobené vrstvě nejsou vhodné podmínky pro buněčnou proliferaci.

Další vědecký článek o inkorporaci buněk do nanovláken (Fatih Canbolat, 2011) [3] popisuje zvláknění fibroblastů v PVA, koaxiální zvláknění buněk a vrstvení buněčné suspenze mezi nanovláknenné vrstvy z PVA a PCL (polykaprolaktonu). Výsledky z testování viability buněk, které byly elektrostaticky a koaxiálně zvlákněny ukázaly neschopnost buněk tento proces přežít. Změnou parametrů a testováním viability v různých částech experimentu byl hledán důvod mortality buněk. Jako hlavní důvod autoři uvádí deformaci buněčné stěny při formování vláken a následnou dehydrataci. Metoda vrstvení PVA nanovláken, buněčné suspenze a PCL nanovláken prokázala vyšší viabilitu buněk než u samotného zvláknění buněk. Viabilita po prvním dni kultivace byla 60% a po třech dnech klesla na pouhých 20%. Autoři udávají jako důvod vypařování rozpouštědla (chloroformu) z PCL vláken při procesu elektrostatického zvláknění.

Justin T. Seil a Thomas J. Webster uvádějí v International Journal of Nanomedicine [4] jiný přístup k inkorporaci buněk do nanovláknenných vrstev. Jejich metoda spočívala ve vstřikování buněčné suspenze do vytvářející se nanovláknenné vrstvy. Buněčná suspenze byla v pravidelných intervalech vstřikována přímo na vytvářenou nanovláknennou vrstvu metodou elektrostatického zvláknění a následně byl takto vyrobený vzorek kultivován. Pomocí kontrolních vzorků bylo zjištěno, že samotné vstřikování buněk nemá vliv na jejich viabilitu. Viabilita buněk, které byly vstřikovány do vytvářející nanovláknenné vrstvy byla nepatrně menší než u kontrolních buněk. Autoři pro další experimenty navrhuji použít menší objem buněk v suspenzi a její častější vstřikování do vrstvy – k docílení homogenního rozmístění buněk. Dále doporučují experiment provádět ve sterilním prostředí kvůli testování viability buněk po delších dobách kultivace.

Výsledky experimentů inkorporace buněk do nanovláken/nanovlákných vrstev zamícháním do roztoku a následné elektrostatické zvláknění nepřinášejí velké naděje k úspěšné aplikaci. Perspektivnější cesta pro nasazení buněk do celého objemu nanovlákné vrstvy je vstřikování nebo vkapávání buněčné suspenze do vytvářené nanovlákné vrstvy. Problémem pro viabilitu buněk zde může být odpařující se rozpouštědlo, které se používá pro polymery nerozpustné ve vodě. Vzhledem k tomu, že musí být buňky stále ve vodném prostředí, měl by proces probíhat tak, aby buňky nebyly vystaveny dehydrataci. Dále je třeba celý proces provádět ve sterilním prostředí, aby mohla být buněčná proliferace sledována po dobu několika dní.

Další cestou, jak zvýšit proliferaci fibroblastů do nanovlákných vrstev, je použití růstových faktorů. Růstové faktory obsažené v krevních destičkách, tedy trombocytech, mají mimo jiné pozitivní vliv na proliferaci buněk [5]. Pokud by buněčný nosič obsahoval růstové faktory, mohly by fibroblasty lépe proliferovat do jeho celého objemu.

2.2 Základní principy tkáňového inženýrství

Tkáňové inženýrství je interdisciplinární obor, který využívá principy technických a biologických vědních oborů pro vývoj biologických náhrad. Tyto biologické náhrady mají za úkol obnovit, zachovat či zlepšit funkci tkáně či celého orgánu.

Se zvyšující se kvalitou života a zdravotní péče lidé dosahují vyššího věku a chtějí být déle aktivní. Vzhledem k tomu, že v lidském těle dochází k přirozenému opotřebování tkání, kloubů či celých orgánů, je nutné obnově či zlepšení funkce tkání pomoci.

Potřeba vytvářet biologické náhrady byla také podmíněna nedostatkem orgánů vhodných pro transplantaci a nutností imunosuprese pacienta podrobujícího se transplantaci. Osídlení biologické náhrady přímo vlastními buňkami potlačí imunologické reakce, tedy pooperační komplikace [6].

2.2.1 Buněčné nosiče

Buněčné nosiče (tzv. scaffoldy) tvoří podpůrnou konstrukci pro osídlení a růst buněk. Jedním z nejdůležitějších předpokladů pro kvalitní buněčný nosič je, aby se jeho struktura a funkční vlastnosti podobaly přirozené mezibuněčné hmotě

(ECM=Extracellular matrix). ECM je systém molekul proteinů a polysacharidů vyplňující mezibuněčný prostor [7].

Funkce ECM:

- vyplňuje mezibuněčný prostor, váže tkáň a buňky k sobě
- určuje mechanické a ostatní fyzikální vlastnosti tkáně

Buňky pojivové tkáně produkující ECM jsou:

- fibroblasty (u většiny pojivových tkání),
- chondroblasty (v chrupavce),
- osteoblasty (v kostech) [7].

Dalším důležitým faktorem pro kvalitní a funkční buněčný nosič je správně zvolený materiál. Použitý materiál musí mít tyto vlastnosti:

Biokompatibilita

Biokompatibilita = snášenlivost materiálu v biologickém prostředí

Biokompatibilní materiál se posuzuje podle interakce s prostředím - podle cytotoxického působení, podle toxikologických a alergických reakcí, podle karcinogenních, teratogenních či mutagenních reakcí, podle vlivu na infekční procesy, podle rozsahu a kvality biodegradace. Důležité je, aby materiál neovlivňoval např. srážlivost krve, nevyvolával zánětovou reakci, neuvolňoval potenciálně toxické látky apod. [8].

Biodegradabilita

Biodegradabilita = schopnost degradace materiálu přirozeným způsobem v organismu bez důkazů o jeho vyloučení z těla [8].

Další důležité vlastnosti jsou [9]:

- Přítomnost určitých chemických funkčních skupin (-OH, -NH₂),
- povrchová energie, polarita, smáčivost (žádoucí je mírná hydrofilita),
- morfologie povrchu (drsnost, topografie; velikost, tvar a vzdálenost nerovností, významná je nanodrsnost),

- mechanické vlastnosti povrchu materiálu,
- elektrické vlastnosti materiálu.

Obecně by se vlastnosti buněčného nosiče měly odvíjet od druhu tkáně, kterou mají zastupovat.

Pro výrobu lze použít materiál:

- Biologický, např. kolagen, fibrin, kyselina hyaluronová,
- syntetický, např. syntetické polymery, kovy, keramika.

2.2.2 Struktura buněčného nosiče

Obecně je ideální struktura buněčného nosiče ta, která se nejvíce podobá nahrazované tkáni. Žádoucí je tvorba trojrozměrných (3D) nosičů, které se strukturou nejvíce blíží přirozené tkáni. Struktura buněčného nosiče by měla mít dostatek pórů, které jsou vzájemně propojené pro lepší vrůstání buněk a transport živin.

Buněčné nosiče jsou vyráběny v různých tvarech, jako jsou např. pěny, gely, houby a textilie (pleteniny, tkaniny a netkané textilie). Mezi netextilní technologie patří vylučování solí, rozdělování fází, formování taveniny, trojrozměrný tisk, lyofilizace emulzí, plynové zpěnování, atd. Do textilních technologií výroby buněčných nosičů se řadí pletení, tkaní, různé technologie netkaných textilií, jako např. zvlákňování za mokra, pojení vláken nebo elektrostatické zvlákňování [6].

Velice často se využívá kombinací technik ať už netextilních s textilními nebo různých technik textilních.

Pro výrobu buněčných nosičů se osvědčily netkané textilie, mezi jejichž hlavní výhody patří náhodná orientace vláken, možnost tvorby trojrozměrných struktur, velká porozita (dobrá proliferace buněk), velikost a povrch vláken usnadňující adhezi buněk. Čím jsou vlákna jemnější, tím poskytují větší specifický povrch ve vztahu k objemovému podílu.

Kolagenová vlákna obsažená v extracelulární matrici mají průměry v nanometrech, proto je nutné vyvíjet buněčné nosiče s těmito vlastnostmi.

2.2.3 Osidlování buněčných nosičů

Dalším krokem v procesu tkáňového inženýrství je osídlení buněčného nosiče buňkami. Vhodný buněčný nosič by měl mít dostatek pórů pro snadnou proliferaci buněk a rovnoměrný transport živin do celého svého objemu. S tím souvisí i hydrofobita materiálu, ze kterého je buněčný nosič vyroben. Příliš hydrofóbní materiály lze obtížně smáčet v médiu, které pro buňky znamená zdroj živin.

V případě, že je buněčný nosič osídlen buňkami pouze na jeho povrchu, buňky mohou vytvořit bariéru pro šíření kyslíku a živin dovnitř nosiče a tím zabránit vrůstání buněk do celého objemu nosiče.

Kultivace buněk v buněčném nosiči může být statická nebo dynamická. Dynamická kultivace lépe simuluje přirozené prostředí ve tkáni, dochází k cirkulaci média a lepší transport živin než u statické kultivace [9].

2.3 Nanovláknenné struktury

Nanovláknna jsou textilní vláknenné útvary, jejichž průměr je menší než 1 μm . Pro jejich výrobu se používají různé syntetické i přírodní polymery.

Nanovláknna se vyznačují mimořádnými vlastnostmi jako je velký měrný povrch (poměr povrchu vlákna k jeho objemu) a velká pórovitost vláknenné vrstvy s malými rozměry pórů. Díky těmto vlastnostem mají velký potenciál např. v medicíně, elektronice, filtraci a v ochraně životního prostředí.

Způsoby výroby nanovláken [10]:

- Dloužení
- Podložková syntéza
- Fázová separace
- Samo-organizování
- Elektrostatické zvlákňování
- Centrifugace

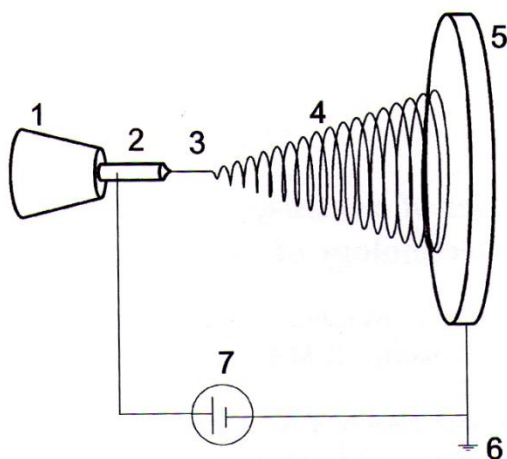
Dále bude popsán pouze proces Elektrostatického zvlákňování, který byl použit v experimentální části této práce.

2.3.1 Elektrostatické zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování je proces, který využívá vysokého napětí k vyvolání kapalinové trysky z roztoku či taveniny polymeru a následnému vytvoření nanovláknenného útvaru [11]. Existuje řada metod elektrostatického zvlákňování, které jsou založeny na stejném principu, liší se pouze v konstrukci, způsobu dávkování polymeru, kontinuitě procesu, apod.

Princip elektrostatického zvlákňování

V procesu elektrostatického zvlákňování je využito vysokého napětí k vytvoření elektrické síly působící na hladinu polymerního roztoku nebo taveniny. Zvlákňovaný polymerní roztok je přímo spojen s elektrodou vysokého napětí např. pomocí kapiláry (trysky). Mezi kapilárou a uzemněným kolektorem působí vysoké elektrické pole v řádu desítek kilovoltů, následkem čehož je na povrchu kapaliny indukován elektrický náboj. Relaxací indukovaného náboje vzniká na výstupu ze zvlákňovací trysky tzv. Taylorův kužel, ze kterého je vytlačována nabitá kapalina ve formě vláken [10,11]. Schéma procesu je znázorněno na obr. 1. Odpaření rozpouštědla nastává při dloužení vznikajících vláken, která se ukládají na povrchu kolektoru a tvoří nanovláknennou vrstvu.



Obrázek 1: Schéma elektrostatického zvlákňování [6]. Stříkačka s dávkovací pumpou (1), kapilára sloužící jako elektroda (2), stabilní část zvlákňování (3), zóna bičování (4), kolektor (5), uzemnění (6), vysoké napětí (7).

Parametry

Mezi parametry ovlivňující proces elektrostatického zvlákňování patří:

- Elektrické napětí,
- koncentrace a viskozita polymerního roztoku,
- molekulová hmotnost polymeru,
- povrchové napětí polymerního roztoku,
- procesní vzdálenost kapilára – kolektor,
- obsah aditiv v polymerním roztoku,
- vlhkost vzduchu.

Aplikace

Nanovlákná jsou využitelná v mnoha oborech, např.:

- zdravotnictví - Biomedicínské aplikace
- automobilový průmysl – kompozity
- životní prostředí - filtrace
- elektronika, apod.

Vzhledem k tomu, že byla na nanovlákných vrstvách testována proliferace buněk, je nezbytné v další kapitole přiblížit problematiku buněčných kultur, jejich získávání a uchovávání v laboratorních podmínkách.

2.4 Buněčné kultury

Kultury rostlinných a živočišných buněk se již dlouho využívají k různým výzkumným účelům např. k vývoji léků a vakcín. Tato skutečnost umožňuje omezení pokusů na zvířatech. Mezi výhody výzkumu s buněčnými kulturami patří např. možnost práce jen s jediným typem buněk, který je dobře definovaný. Na kultivovaných buňkách lze také provádět experimenty, při nichž dojde k jejich zničení [12].

Nevýhodou jsou nefyziologické podmínky, při kterých kultivované buňky rostou. V umělém kultivačním médium, jehož složení neodráží přesně složení vnitřního prostředí v organismu, kultivované buňky postrádají obvyklý tkáňový kontext, tj. přítomnost jiných buněčných typů, s nimiž by *in vivo* komunikovaly a vyměňovaly si nejrozličnější

látky. V důsledku toho se často mění fenotyp kultivovaných buněk, takže jejich vlastnosti nemusejí přesně odpovídat vlastnostem stejných buněk v organismu [12].

Práce s buněčnými kulturami vyžaduje vhodně vybavenou laboratoř, speciální spotřební materiál a chemikálie.

2.4.1 Izolace buněk

Zdrojem buněk pro založení kultury je laboratorní zvíře nebo člověk. První kulturu izolovaných buněk označujeme jako primární kulturu neboli primokulturu. Sekundární kultura čili subkultura vzniká poté, co se buňky z primokultury namnoží, naředí a přenesou do nových kultivačních nádob [12]. Tento postup je označován jako pasážování.

Kultury normálních buněk mají omezenou životnost, po několika pasážích dochází k tzv. zestárnutí kultury – buňky změní svoje vlastnosti a přestanou se dělit. Nádorové buňky většinou stárnutí nepodléhají.

Nejčastěji kultivované buňky se získávají izolací z laboratorního potkana, myši, králíka, často se kultivují i lidské buňky. Obvykle se používají postupy založené na kombinaci mechanického rozvolnění tkáně a enzymatického natrávení mezibuněčné hmoty kolagenasou, elastasou, trypsinem apod. V některých případech stačí nechat vyrůstat buňky přímo z kousku tkáně kultivované za vhodných podmínek (tzv. explantační kultura) tímto způsobem se získávají např. fibroblasty [12].

2.4.2 Kultivační podmínky a média

Základem pro práci s buněčnými kulturami je dokonalé zvládnutí sterilní pracovní techniky a kontrola kontaminace. Vhodné je pracovat ve vyhrazené čisté laboratoři podléhající speciálnímu režimu.

Pro kultivaci buněk se nejčastěji používá jednorázový spotřební materiál se speciální úpravou povrchu (TCP = tissue culture plastic). Používá se také skleněné nádobí, které lze jednoduše sterilizovat za vysoké teploty v autoklávu.

Laboratoř musí být vybavena laminárním boxem, který filtruje vzduch pomocí před-filtrů a HEPA filtrů (vysoce účinný filtr vzduchových částic). Nabízí pracovníkům možnost pracovat ve sterilním prostředí bez mikroorganismů.

Kultivační médium musí mít vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti a obsahovat vhodné koncentrace látek, které buňky potřebují pro život a proliferaci. Médium je vodný roztok s přidavkem různých složek, jako např. anorganické soli, pufrů, glukosa (případně jiné zdroje energie), vitamíny, bílkoviny, růstové faktory, některé peptidy, mastné kyseliny a lipidy a stopové prvky [12].

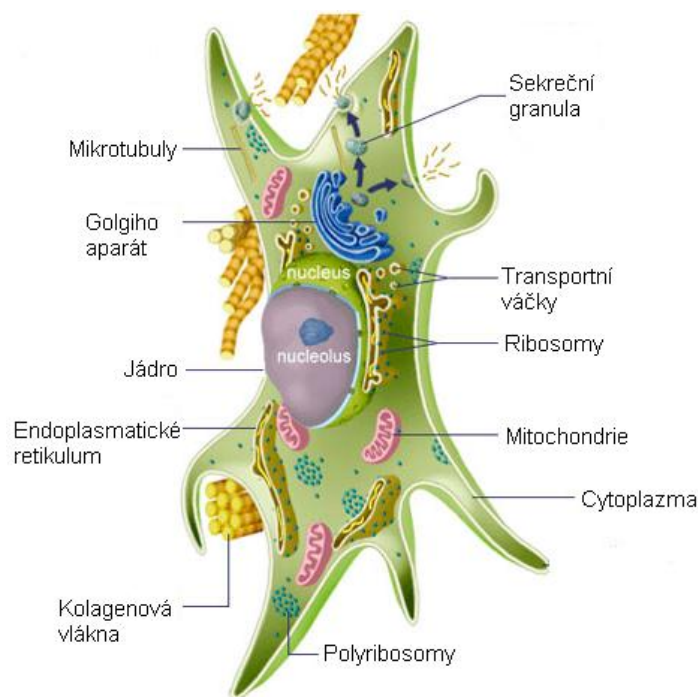
Médium tvoří v kultivační lahvičce tenkou vrstvu kapaliny nad adhezaními buňkami, což napomáhá rychlejší difúzi kyslíku a oxidu uhličitého. Výměna média se provádí zpravidla dvakrát až třikrát týdně. Pro zvýšení růstu buněčné kultury se do kultivačního média může přidávat sérum. Sérum se získává z krve různých živočichů a následnou sterilizací pomocí filtrace. Přídavek séra v kultivačním médiu má celou řadu funkcí. Především do média doplní velkou řadu biologicky významných organických látek, jako jsou růstové faktory, či některé látky významné pro adhezi buněk. Příkladem mohou být stopové prvky, jako zinek, selen, měď, mangan a další, vitamíny a podobně [12].

Dále se do kultivačního média mohou přidávat v malé koncentraci (často 1%) antibiotika, která zabraňují kontaminaci kultury bakteriemi.

Další kapitola je věnována fibroblastům - buňkám, které byly inkorporovány do nanovláknenných vrstev v experimentální části diplomové práce.

2.4.3 Fibroblasty

Fibroblasty jsou nejběžnější a zároveň nejvýznamnější buňky vaziva. Nejčastěji je identifikujeme jako protáhlé, vřetenovité až hvězdicovité buňky s plochým a oválným jádrem viz obr. 2 [13, 14].



Obrázek 2: Struktura fibroblastu [15].

Fibroblasty produkují *tropokolagen* (předstupeň kolagenu), který teprve v mezibuněčném prostoru polymeruje a formuje kolagenní vlákna. Druhým produktem fibroblastů je amorfni mezibuněčná hmota, která slouží jako matrice vyplňující mezery mezi buňkami a kolagenními vlákny v pojivové tkáni [14].

Při vývoji tkáně se fibroblast pohybuje po již vytvořeném kolagenovém vlákne, napíná ho a protahuje do provazců a tak ovlivňuje uspořádání kolagenových vláken. Naopak kolagenová vlákna ovlivňují distribuci fibroblastů [16]. Obě složky jsou součástí ECM.

V experimentální části bylo mimo jiné zjišťováno, zda ovlivňují proliferaci fibroblastů do nanovláknenných vrstev růstové faktory. Růstové faktory podporují buněčnou proliferaci a v procesu reparace poškozených tkání predikují nadějně výsledky řady klinických studií v oblasti orofaciální medicíny (oblast úst a obličeje), traumatologie, ortopedie a chirurgie [17].

2.4.4 Růstové faktory

Růstové faktory jsou látky regulující buněčnou aktivitu, jejich působení na buňky můžeme nejlépe charakterizovat jako modulaci buněčné aktivity stimulací nebo naopak inhibicí buněčné proliferace, diferenciaci, migrace buněk, adheze, apoptózy a genové exprese v jejich jádrech [5].

Růstové faktory jsou obvykle proteiny a jejich efekty jsou zprostředkovány interakcí se specifickými receptory na buněčných membránách. Tato interakce může probíhat v okolí secernující buňky a ovlivňovat tak buňky sousední (*parakrinní* působení) nebo také samotnou produkující buňku (*autokrinní* působení) [5].

Některé z růstových faktorů dokáží stimulovat množství odlišných buněčných typů, jiné jsou přísně specifické. Růstové faktory mají označení podle své funkce (resp. prvotně objevené funkce – například Fibroblast Growth Factor, FGF) [17].

V procesu regenerace pojivových tkání se nejvíce uplatňují polypeptidy primárně syntetizované megakaryocyty: Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factor β -1 (TGF β -1), Epidermal Growth Factor (EGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). V inaktivní formě se nacházejí v granulech trombocytů, ze kterých jsou po aktivaci uvolňovány například působením trombinu při hemostáze [17].

Trombocyty, které byly použity jako zdroj růstových faktorů pro zvýšení proliferace fibroblastů do nanovlákněné vrstvy, jsou popsány v následující podkapitole.

2.4.5 Trombocyty

Trombocyty (krevní destičky) jsou označovány jako neúplné buňky, protože nemají jádro. Jsou to drobná, kulovitá až vřetenovitá tělíska o velikosti 2-4 μm . V krvi jich je $0,15-0,3 \times 10^{12}/\text{l}$ (150 000 – 300 000/ μl). Na krevních nátěrech se trombocyty vyskytují velmi často ve shlucích nebo agregátech [13].

Struktura trombocytu se skládá ze zevního pláště, hyaloplasmy a organel. Zevní plášť je složen z komplexů glykoproteinů a mukopolysacharidů. Na jeho povrchu se často nachází membrána tzv. glykokalyx. Hyaloplasma zodpovídá za tvar trombocytu a jeho případné změny prostřednictvím systému vláken (mikrofibrily, mikrofilamenta a mikrotubuly). Mezi organely trombocytů patří mitochondrie, Golgiho aparát a především četná granula. Ty se pak dále dělí na několik skupin podle svého obsahu. Mezi hlavní skupiny se dle [13] řadí:

- α - granula (obsahují např. fibrinogen, destičkový faktor 4 a řadu jiných chemotaktických, destičkových a koagulačních faktorů),
- δ - granula (ATP, ADP, Ca, serotonin a další) a
- γ - granula (lysozomální enzymy).

Trombocyty jsou důležité při *hemokoagulaci*. Poškodí-li se endotel v cévě, krevní destičky působením kolagenu adherují k obnaženému místu za vzniku tzv. destičkové zátky (bílý trombus). Rozpadem trombocytů se uvolňuje jejich obsah a startuje tzv. *koagulační kaskáda*, do které je zapojeno 13 plazmatických proteinů. Výsledkem je vznik prostorové sítě z fibrinových vláken, v níž se zachytí unikající krevní tělíska, takže poškozené místo se posléze ucpe definitivní zátkou (červený trombus). Definitivní zátka je v další fázi buďto postupně odstraněna enzymem plazminem anebo se vazivově organizuje. Životnost trombocytů se odhaduje na 7-10 dnů, poté jsou degradovány ve slezině [13].

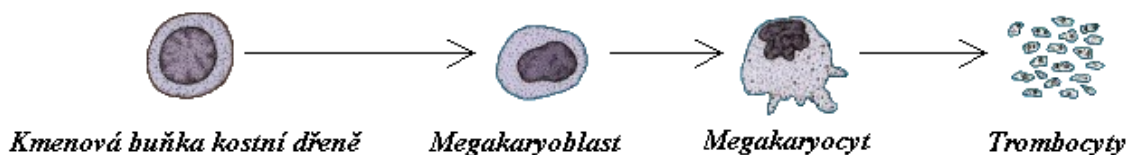
Vývoj trombocytů

Vznik krevních destiček, tzv. *Trombopoéza* je schematicky znázorněna na obr. 3. Krevní destičky vznikají fragmentací cytoplazmy zralých *megakaryocytů*, které pocházejí z *megakaryoblastů*.

Megakaryoblast je buňka velká asi 15-45 μm , s oválným až ledvinovitým jádrem, obsahujícím několik jadérek. Její cytoplazma vytváří kolem jádra úzký lem.

Megakaryocyty jsou 80-150 μm velké buňky, které obsahují mnohonásobně členěné jádro s hrubou strukturou chromatinu. Jádro nemá jadérka. Cytoplazma vytváří okolo jádra široký lem. Je protkána početnými a bohatě se větvícími invaginacemi buněčné membrány (tzv. *demarkační membrány* či kanály), které rozdělují cytoplazmu na políčka. Odštěpováním cytoplazmatických políček podél demarkačních membrán vznikají trombocyty, z jednoho megakaryocyty 4-8 tisíc [13].

Trombopoéza



Obrázek 3: Vývoj trombocytů.

Získávání trombocytů

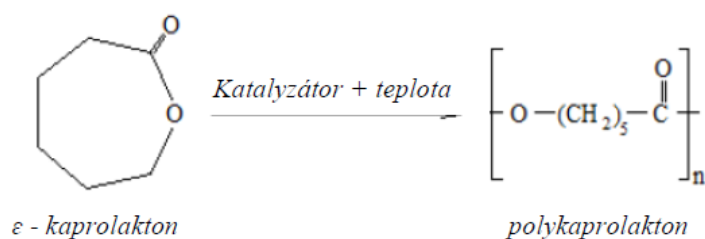
Díky separátorům krevních elementů v klinické praxi je možný rychlý a efektivní sběr plazmy bohaté na trombocyty – PRP (Platelet Rich Plasma). Takto vytvořená PRP představuje koncentrovanou suspenzi růstových faktorů, které jsou schopny významným způsobem navodit a podpořit fyziologický proces reparace a regenerace tkání [5]. Centrifugace je další způsob získávání roztoku bohatého na trombocyty – TRS (thrombocyte rich solution).

3. Materiál a metody

V následující kapitole jsou popsány materiály a metody, které byly použity v experimentální části práce.

3.1 Polykaprolakton

Pro elektrostatické zvlákňování byl použit biodegradabilní polymer – polykaprolakton. Jedná se o biologicky degradovatelný polyester s nízkou teplotou tání kolem 60°C a nízkou teplotou skelného přechodu kolem 72°C, který se typicky připravuje katalytickou polymerizací s otevřením kruhu kaprolaktonu. Jako katalyzátor se při reakci používá nejčastěji 2-ethylhexanoat cínatý (tzv. cínatý oktanoat) [18]. Příprava polykaprolaktonu probíhá dle schématu reakce na obr. 4.



Obrázek 4: Schéma přípravy polykaprolaktonu.

PCL je biokompatibilní a zároveň biodegradabilní polymer, který je využíván pro medicínské účely. Využívá se při výrobě chirurgických nití pro vnitřní stehy, jako nosič léků, u kterých je potřeba postupné uvolňování do těla, nebo pro tvorbu buněčných nosičů.

V experimentální části byl použit PCL o molekulové hmotnosti 45.000 (Sigma Aldrich). Pro přípravu roztoku PCL o koncentraci 18mg% byla použita rozpouštědla chloroform a etanol v poměru 9:1.

3.1 Použitá kultivační média

Myší fibroblasty 3T3 byly kultivovány v Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza) s přidavkem 10% fetálního bovinního séra (FBS, Lonza) a 1% směsi antibiotik (penicil, streptomycin, amfotericin B, Lonza).

Lidské fibroblasty NHDF (Normal Human Dermal Fibroblasts) byly kultivovány ve Fibroblast Basal Medium (FBM) obohaceném 20% fetálního bovinního séra (FBS), 1% fibroblastového růstového faktoru (FGF), 1% insulinu a 1% směsí antibiotik.

V průběhu kultivace buněk bylo médium vyměňováno podle potřeby buněk, většinou 2x – 3x za týden. Podle nárůstu buněk, tzv. stupně konfluence, se připravuje médium v různých poměrech podle tab. 1. Pokud buněčná kultura zaujímá méně než 50 % z celkové plochy dna kultivační nádoby, je stupeň konfluence < 50%. V opačném případě je stupeň konfluence > 50% [19].

Tabulka 1: Množství média vztažené na stupeň konfluence.

Stupeň konfluence	Množství média na 5 cm ²	Objem média pro kultivační lahvičku 25 cm²	Objem média pro kultivační lahvičku 75 cm²
< 50%	1 ml	5 ml	15 ml
> 50%	1,5 ml	7,5 ml	20 ml

3.2 Pasážování buněk

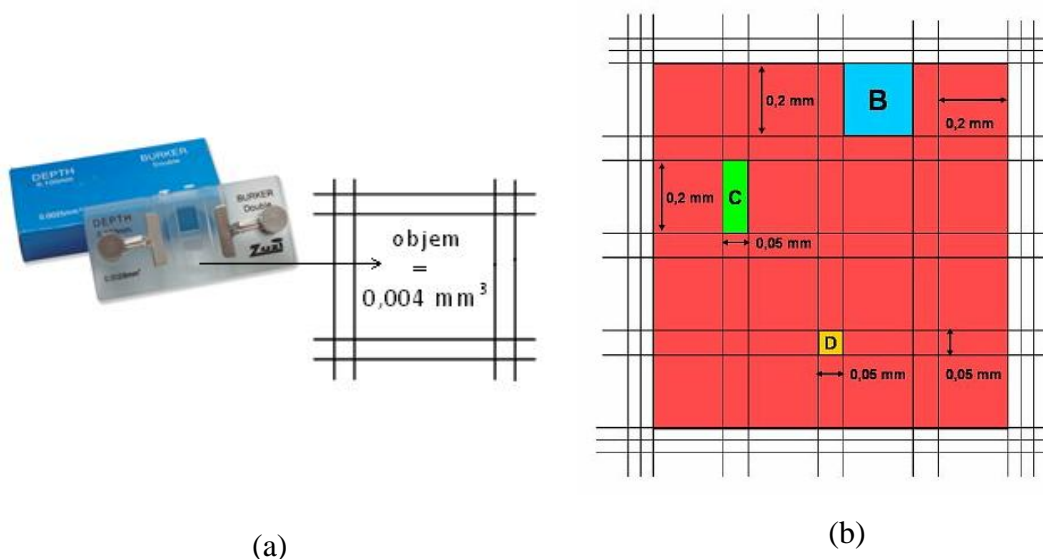
Po určité době buňky z média vyčerpají živiny a namnoží se tak, až pokryjí celé dno kultivační nádoby. Než dojde k úplnému pokrytí dna, je nutné buňky odebrat, naředit je na nižší koncentraci a dát kultivovat do nových kultivačních nádobek. Tomuto procesu se říká pasážování buněk. Pasážování se provádí, pokud buňky pokrývají 70 – 80% povrchu kultivační nádoby [19].

Pracovní postup

Po odsátí starého média se buňky opláchnou pufrem kvůli stabilizaci pH a úplnému odstranění média, které obsahuje mimo jiné i antitrypsin a blokoval by trypsin. Následně je do kultivační nádoby přidán na velmi krátkou dobu (2 - 3 minuty) trypsin - trávicí enzym, který má za následek, že se fibroblasty odpoutají ode dna nádoby a zaujmou kulovitý tvar. Poté je nutné přidat kultivační médium pro neutralizaci působícího trypsinu. Celý objem se přenesse do sterilní zkumavky a pomocí Bürkerovy komůrky se zjistí počet buněk na 1ml. Buňky se nasadí do nových sterilních kultivačních lahvíček s kultivačním médiem nahřátým na 37°C. Kultivační lahvičky se uloží do termostatu při stálé teplotě 37°C a atmosféře 5% CO₂.

Bürkerova komůrka

Bürkerova komůrka znázorněna na obr. 5 je mikroskopické sklíčko s vybroušenou mřížkou, které slouží ke stanovení počtu buněk. Mřížka má definované rozměry a dělí se na tzv. komůrky o dané hloubce. Prostor mezi podložním a krycím sklíčkem má tak přesně definovaný objem [1]. Pro experiment byla používána komůrka s plochou 0,04 mm² a hloubkou 0,1 mm (v obr. 5(b) - vyznačen modrou barvou a písmenem B). Objem této komůrky je tedy 0,004 mm³. Průměrný počet buněk byl počítán z 25 těchto komůrek a byly započítávány pouze buňky ležící uvnitř komůrky a buňky ležící na dvou dělicích ryskách. Počet buněk v suspenzi je pak možné dopočítat na objem 1 ml.



Obrázek 5: a) Bürkerova komůrka, b) rozměry komůrek oddělených ryskami.

3.3 Přímé stanovení viability buněk

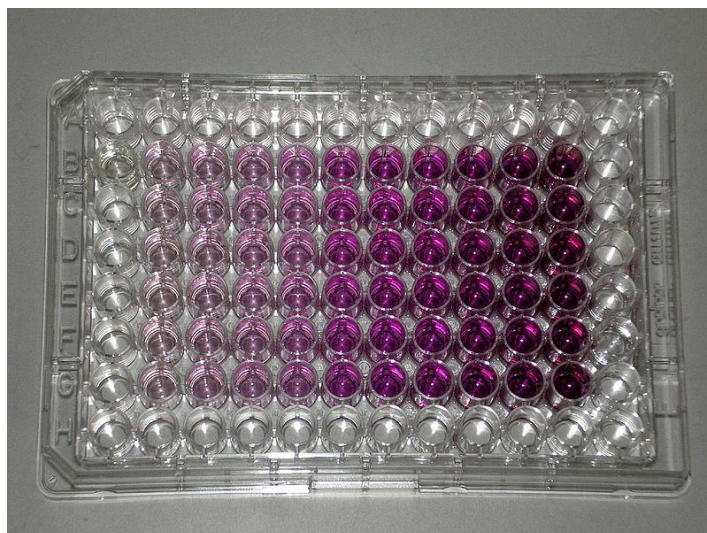
Pro přímé stanovení viability buněk v suspenzi je nejčastěji využíváno Trypanové modři. Tato metoda je založena na skutečnosti, že pokud je zdravá buňka vystavena okolnímu prostředí se specifickým barvivem (v tomto případě Trypanová modř), nepustí barvivo do intracelulárního prostoru díky integritě buněčné membrány a funkčnosti transportních systémů. Naopak buňky mrtvé či poškozené se nabarví Trypanovou modří. Buněčnou suspenzi v roztoku Trypanové modři hodnotíme mikroskopicky v Bürkerově komůrce (viz 3.2), kdy určíme jak počet buněk v daném objemu buněčné suspenze, tak i podíl živých buněk v celkové buněčné populaci [20].

3.4 Vyhodnocování viability buněk – MTT test

Pro vyhodnocení viability buněk byl použit MTT test. Vychází ze skutečnosti, že v živé buňce fungují mitochondriální dehydrogenasy, zatímco v buňce poškozené či mrtvé nikoliv. Buněčná kultura se inkubuje s roztokem tzv. methyltetrazoliové soli (odtud MTT), což je sloučenina, která v oxidovaném stavu má žlutou barvu a ve stavu redukovaném tmavě fialovou barvu. Stupeň konverze MTT na fialový produkt je tedy přímo úměrný aktivitě mitochondriálních dehydrogenas a tedy životnosti buněk [20].

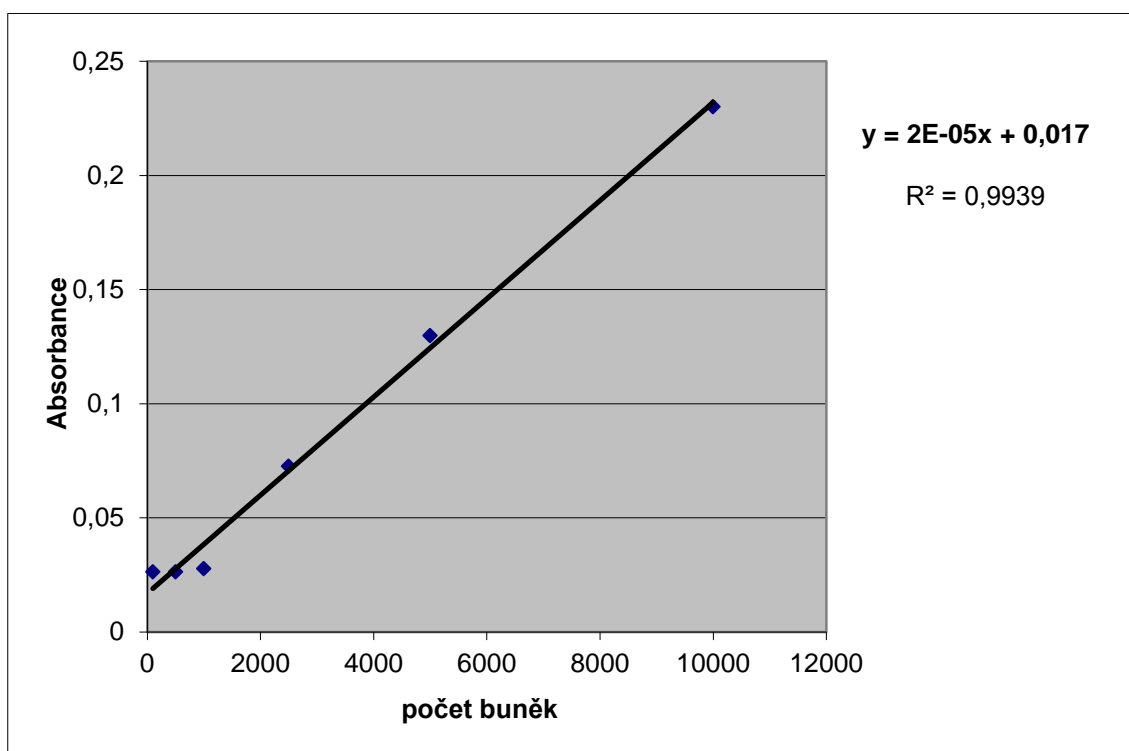
Žluté MTT se mitochondriálními enzymy dýchacího řetězce redukuje na fialový formazanový derivát, který zůstává uvnitř buněk ve formě nerozpustných krystalků. Formazan se rozpustí přidáním okyseleného isopropanolu a toto zabarvení (viz obr. 6) se dále vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm a referenční vlnové délce 650nm. Od hodnot absorbance při vlnové délce 570 nm se odečtou hodnoty absorbance při referenční vlnové délce 650 nm. Dále je z měření vyhodnocena průměrná hodnota absorbance a směrodatná odchylka.

Princip konverze byl popsán v roce 1954 Blackem a Speerem a metoda byla zavedena do laboratorní praxe Mosmanem v roce 1983 (tzv. kolorimetrický test stanovení životnosti buněk) [21].



Obrázek 6: MTT test. Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk - čím tmavší barva, tím vyšší množství živých buněk.

Vztahu mezi hodnotou absorbance a počtem buněk odpovídá graf na obr. 7. Podle rovnice odpovídající přímce lineární regrese byl u výsledných hodnot absorbance vypočten odpovídající počet buněk.



Obrázek 7: Vztah mezi hodnotami absorbance MTT testu a počtem buněk.

3.5 Fixace buněk

Tkáně a orgány po zástavě přísunu kyslíku rychle podléhají autolýze, která je způsobena degradací buněčného obsahu uvolněnými enzymy. K zamezení autolýzy se používá fixace, jejíž podstata tkví v koagulaci a denaturaci bílkovin buněk a tkání [13].

Při fixaci jsou buňky rychle usmrceny, popř. jsou zastaveny již započaté autolytické pochody. Následně mohou být pozorovány elektronovou mikroskopií.

K fixaci vzorků se v elektronové mikroskopii používají nejčastěji aldehydy (glutaraldehyd a formaldehyd). Měkké tkáně je třeba pro pozorování v rastrovacím elektronovém mikroskopu fixovat a odvodnit vzestupnou řadou alkoholů [13]. Poté je nutné vzorek úplně vysušit např. v termostatu.

3.6 Mikroskopie

V experimentální části byla používána optická, fluorescenční a skenovací elektronová mikroskopie.

Optická

K pozorování buněk byl použit inverzní světelný mikroskop NIB-100F (Novel Optics). Optický mikroskop byl využit pro kontrolu růstu buněk a buněčné suspenze při pasážování. Dále pro stanovení viability buněk pomocí Trypanové modři (Sigma Aldrich).

Fluorescenční

Inverzní světelný mikroskop NIB-100F je vybaven fluorescenční lampou. Metodou fluorescence bylo možné pozorovat jádra buněk v nanovlákněných vrstvách. Jádra buněk byla obarvena Propidium jodidem (Sigma Aldrich), který se specificky váže na DNA. Excitační záření (vlnová délka) pro Propidium jodid je 540 nm, což odpovídá modro – zelené barvě a emitované záření o vlnové délce 615 nm, což odpovídá barvě červené.

Elektronový mikroskop

Pro pozorování elektrostaticky zvlákněných struktur byl využit skenovací elektronový mikroskop Phenom™ Scanning Electron Microscope. Vzorky byly pozorovány pomocí detektoru sekundárních elektronů, který poskytuje pohled na vzorek v topografickém

kontrastu. Aby bylo zabráněno kumulaci elektrostatického náboje, byl povrch vzorků před pozorováním vakuově naprášen vrstvičkou zlata pro vyšší vodivost.

Konfokální mikroskop

Konfokální mikroskop je druhem optického mikroskopu, jehož výhodou je vyšší rozlišovací schopnost daná detekcí světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu [22]. Pro pozorování vyrobených struktur byl použit konfokální mikroskop Leica DM 2500 CSQ V-VIS. Příprava vzorků byla shodná jako pro fluorescenční mikroskop.

4. Experimentální část

Experimentální část je rozdělena z koncepčního hlediska do dvou hlavních podkapitol, které popisují postup jednotlivých experimentů.

První podkapitola obsahuje experimenty za použití myších 3T3 fibroblastů inkorporovaných do nanovlákných vrstev během procesu elektrostatického zvlákňování. Druhá podkapitola se zabývá inkorporací trombocytů do nanovlákných struktur a sledování proliferace lidských fibroblastů.

4.1 Inkorporace fibroblastů do nanovlákných vrstev

Tato podkapitola se zabývá inkorporací fibroblastů do nanovlákných vrstev pomocí různých metod.

Metody inkorporace buněk:

- a) Proliferace buněk z povrchu buněčného nosiče
- b) Inkorporace buněk Pasteurovou pipetou
- c) Inkorporace buněk mechanickým rozprašovačem

Podmínky shodné pro všechny experimenty jsou popsány níže.

Zařízení pro elektrostatické zvlákňování bylo umístěno do laminárního boxu z důvodu dodržení sterilního prostředí. Toto zařízení na obr. 8 se skládalo ze stojanu, na kterém byla upevněna injekční stříkačka s jehlou (1). Na jehlu byl připojen zdroj vysokého napětí (2). Pod jehlou byla umístěna uzemněná Petriho miska (3) naplněná 20 ml kultivačního média.

Parametry elektrostatického zvlákňování:

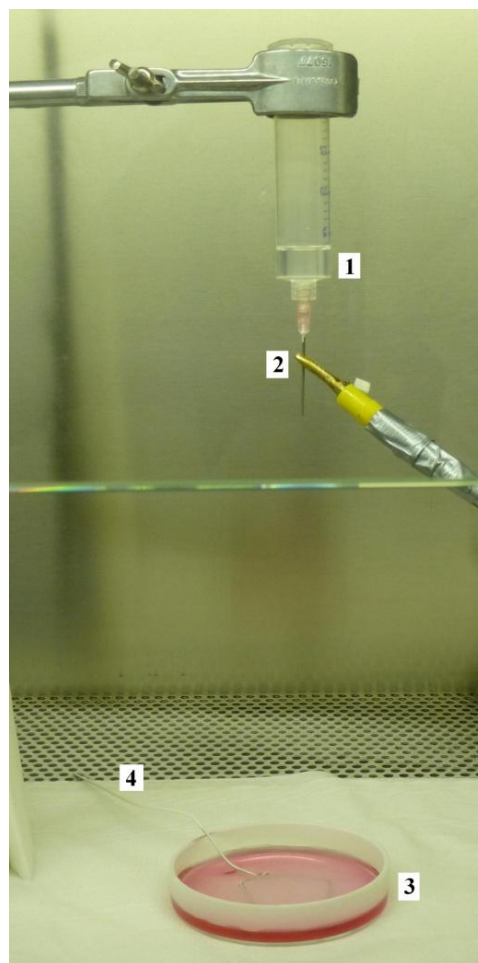
Teplota v laboratoři byla 25°C a relativní vlhkost vzduchu 22%. Vzdálenost kolektoru od kapiláry byla 17 cm. Polymer pro zvlákňování byl zvolen PCL, viz 3.1.

Další postup se liší v použité metodě inkorporace fibroblastů do nanovláknenných struktur.

Z vyrobených struktur byly následně vykrájeny vzorky odpovídající rozměrům 96-jamkové testovací destičky, do které byly vloženy kvůli testování proliferace buněk. Ke každému takto připravenému vzorku bylo přidáno 200 µl kultivačního média.

Inkubační podmínky byly pro všechny tyto experimenty stejné. Inkubace probíhala po dobu 7 dnů v termostatu za stálé teploty 37°C v atmosféře 5% CO₂. V průběhu kultivace bylo druhý a pátý den vyměněno kultivační médium. Hodnocení kultivace probíhalo 2. a 7. den.

Vzorky určené k elektronové mikroskopii byly fixovány 2,5% glutaraldehydem (Sigma Aldrich) a následně promyty etanolovou řadou (60%, 70%, 80%, 90%, 96% a 100% etanol od firmy Penta). Po promytí vzorků následovalo jejich sušení v termostatu.



Obrázek 8: Schéma elektrostatického zvlákňování: 1 - stříkačka s polymerem, 2 - přivedené vysoké napětí, 3 - Petriho miska s médiem, 4 – uzemnění.

Vzorky pro fluorescenční mikroskopii byly zafixovány v metanolu (Penta), promyty v pufru PBS (Lonza) a obarveny fluorescenčním barvivem Propidium jodid (Sigma Aldrich).

a) Elektrostatické zvlákňování do média

Cílem elektrostatického zvlákňování do kultivačního média bylo vytvořit nanovláknennou vrstvu, na které bude následně zjišťována proliferace buněk pouze z jejího povrchu. Takto osídlený vzorek následně sloužil k porovnávání proliferace buněk z povrchu nosiče a proliferace inkorporovaných buněk uvnitř nosiče.

Zařízení pro zvlákňování je popsáno v kapitole 4.1. Hodnota napětí při zvlákňování byla 16 kV. Zvlákňování probíhalo 60 min při dávkování polymeru 10 ml/hod.

Ke vzorkům pro testování proliferace buněk v 96-ti jamkové destičce bylo přidáno 200 μ l kultivačního média s buněčnou suspenzí. Uvnitř každé jamky s testovaným vzorkem bylo přibližně 8000 buněk.

b) Metoda inkorporace buněk Pasteurovou pipetou

Cílem této metody bylo zajistit prorůstání buněk v celém objemu vyrobeného buněčného nosiče. Pro vkapávání buněk do vytvářené nanovláknenné vrstvy byla použita Pasteurova pipeta na obr. 9.



Zařízení a parametry jsou popsány v kapitole 4.1.

V průběhu elektrostatického zvlákňování byla v pravidelných intervalech (10 min) přidávána Pasteurovou pipetou buněčná suspenze o koncentraci

Obrázek 9: Pasteurova pipeta.

$1,5 \times 10^5$ buněk v 1 ml. Dávkování polymeru bylo 10 ml/hod. Zvlákňování probíhalo 60 min.

Celkem bylo do vytvářené vrstvy přidáno 12 ml buněčné suspenze, tzn. 18×10^5 buněk. Počet buněk na vzorek o velikosti 96-ti jamkové destičky byl zjištěn z plochy celé vyrobené nanovláknenné vrstvy a množství vkapaných buněk. Přibližně bylo v každém testovaném vzorku 8000 buněk.

c) Metoda inkorporace buněk mechanickým rozprašovačem

Touto metodou mělo být docíleno rovnoměrného rozmístění fibroblastů v celém objemu vyráběného buněčného nosiče.

Použité zařízení a parametry byly shodné jako u experimentu popsaneho v podkapitole 4.1. V průběhu elektrostatického zvlákňování byla v pravidelných intervalech (5 min) vstřikována buněčná suspenze o koncentraci $1,5 \cdot 10^5$ buněk v 1 ml. Vstřikování buněčné suspenze bylo zajištěno mechanickým rozprašovačem. Celkem bylo do vytvářející vrstvy přidáno 12 ml buněčné suspenze. Zvlákňování probíhalo 60 min při dávkování polymeru 10 ml/hod. Počet buněk na vzorek o velikosti 96-ti jamkové destičky byl přibližně 8000.

4.1.1 Vyhodnocení metod

V této podkapitole jsou shrnuty výsledky provedených experimentů z podkapitoly 4.1. Buněčná proliferace byla sledována pomocí MTT testu. Fluorescenčním mikroskopem bylo pozorováno rozmístění buněk ve vyrobených vrstvách. Pomocí elektronového mikroskopu byly pořízeny snímky povrchu vrstev.

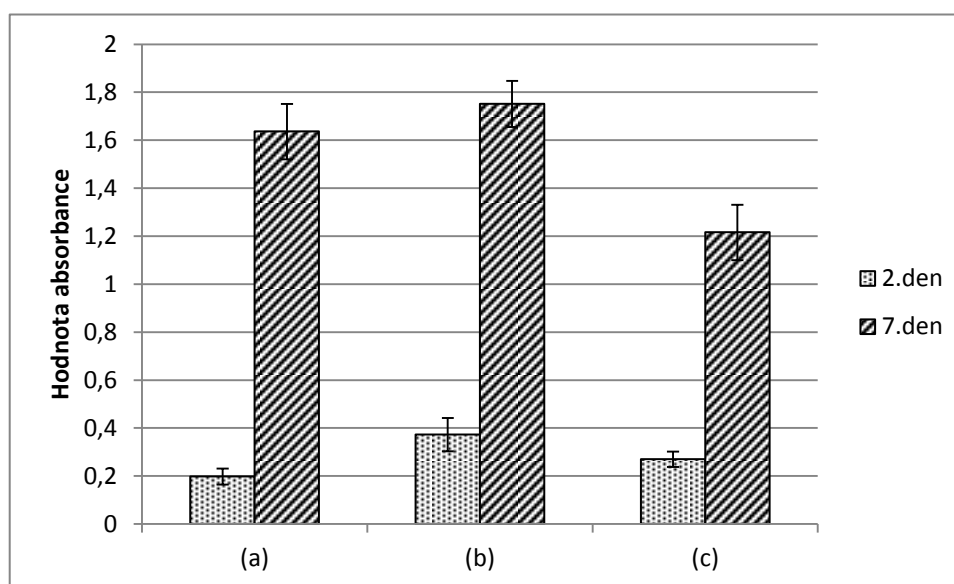
MTT test

Výsledky buněčné proliferace získané pomocí MTT testu jsou uvedeny v tabulce 2. Shrnutí těchto výsledků znázorňuje graf na obr. 10.

Tabulka 2: Výsledky MTT testu 2. a 7. den kultivace pro všechny použité metody:

(a) Proliferace buněk z povrchu, (b) Inkorporace buněk Pasteurovou pipetou, (c) Inkorporace buněk mechanickým rozprašovačem.

Den	Metoda inkorporace 3T3 fibroblastů	Hodnota absorbance	Směrodatná odchylka
2	(a)	0,19775	0,03298
	(b)	0,305	0,036558
	(c)	0,206	0,018125
7	(a)	1,63575	0,114933
	(b)	1,7515	0,096365
	(c)	1,2155	0,115104



Obrázek 10: Výsledky buněčné proliferace v 2. a 7. den kultivace pro použité metody: (a) Proliferace buněk z povrchu, (b) Inkorporace buněk Pasteurovou pipetou, (c) Inkorporace buněk mechanickým rozprašovačem.

Statistickým vyhodnocením metodou ANOVA (testování rozdílů více středních hodnot) v prostředí programu MATLAB bylo zjištěno, že střední hodnoty výše zmíněných metod se na hladině významnosti testu $\alpha = 0,05$ v druhý den kultivace významně neliší. V sedmý den kultivace se střední hodnoty metod (a) a (b) významně neliší, avšak střední hodnota metody (c) se od obou metod předchozích významně liší.

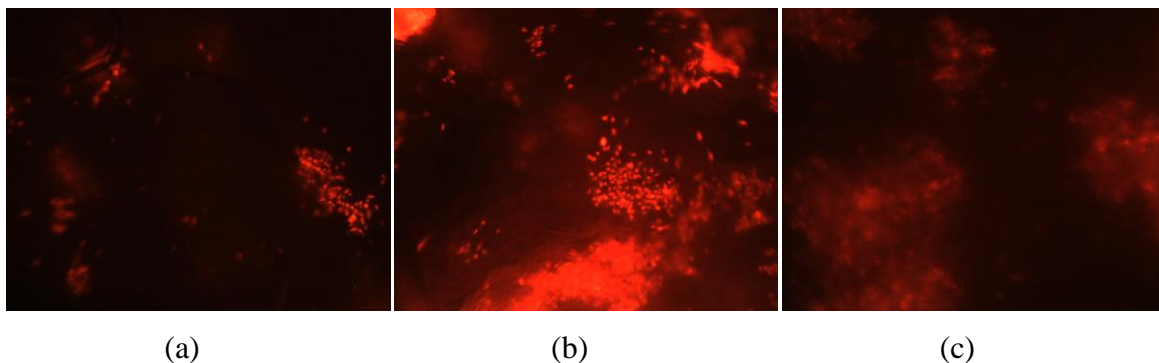
V tabulce 3 je uveden počet buněk, který odpovídá hodnotě absorbance pro každou metodu ve 2. a 7. den kultivace. Přepočet byl proveden dle rovnice lineární regrese na obr. 7 v podkapitole 3.4. Počet buněk po sedmi dnech byl o řád vyšší než v druhý den kultivace.

Tabulka 3: Množství buněk odpovídající hodnotě absorbance 2. a 7. den kultivace pro každou metodu: (a) Proliferace buněk z povrchu, (b) Inkorporace buněk Pasteurovou pipetou, (c) Inkorporace buněk mechanickým rozprašovačem.

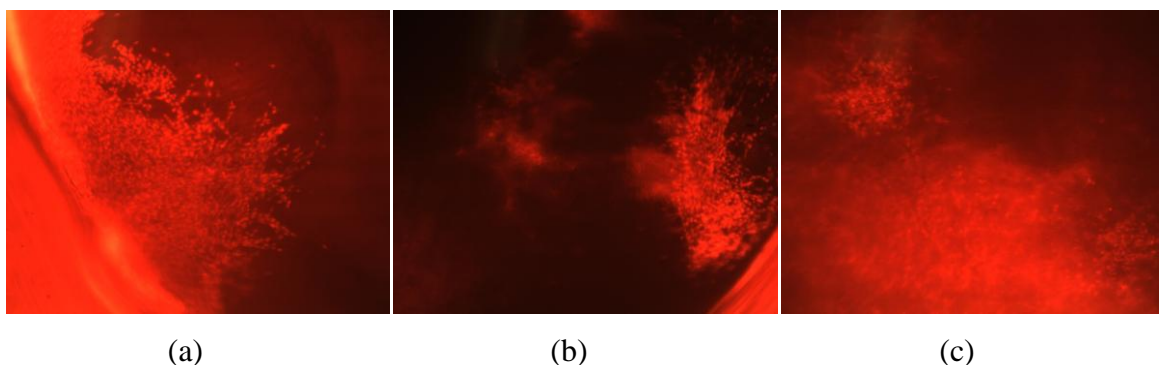
Den	Metoda	Hodnota absorbance	Počet buněk
2	(a)	0,198	$9,05 \times 10^3$
	(b)	0,305	$1,44 \times 10^4$
	(c)	0,206	$9,4 \times 10^3$
7	(a)	1,165	$5,74 \times 10^4$
	(b)	1,752	$8,68 \times 10^4$
	(c)	1,273	$6,28 \times 10^4$

Fluorescenční mikroskopie

Rozmístění buněk v nanovlákněných vrstvách bylo pozorováno metodou fluorescence, viz kapitola 3.8. Na obr. 11 jsou snímky z druhého dne kultivace. Snímky ze sedmého dne kultivace jsou na obr. 12. U všech vzorků byly pozorovány jádra buněk. Vzorky vyrobené metodou Proliferace buněk z povrchu se vyznačovaly zvýšenou koncentrací buněk na okrajích vyrobených vrstev. Na vzorcích vyrobených metodami Inkorporace buněk Pasteurovou pipetou a Inkorporace buněk mechanickým rozprašovačem byla buněčná jádra pozorována v rovnoměrnějším rozprostření pozorované plochy.



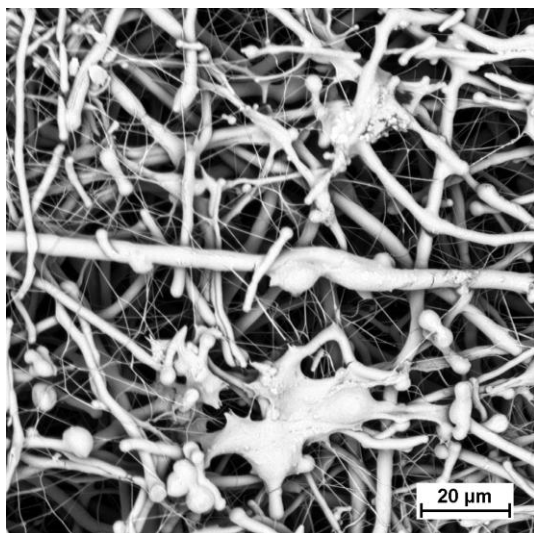
Obrázek 11: Fluorescenční mikroskopie - druhý den kultivace bylo možné pozorovat jádra buněk v nanovlákněných vrstvách (a) Proliferace buněk z povrchu, (b) Inkorporace buněk pasterovou pipetou, (c) Inkorporace buněk mechanickým rozprašovačem. Zvětšení - 100x.



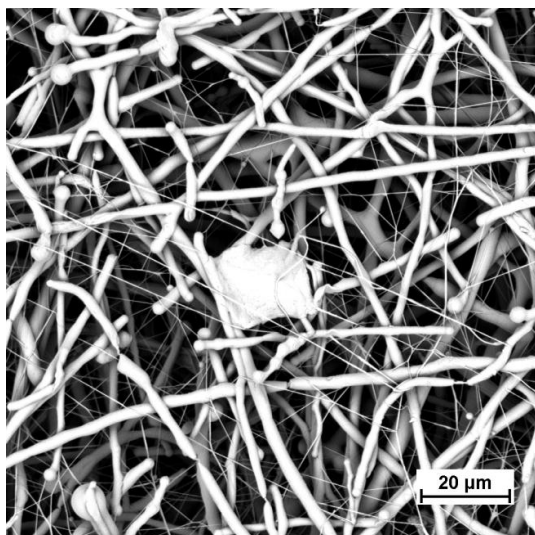
Obrázek 12: Fluorescenční mikroskopie - sedmý den kultivace: (a) Proliferace buněk z povrchu, (b) Inkorporace buněk pasterovou pipetou, (c) Inkorporace buněk mechanickým rozprašovačem. Zvětšení - 100x.

Elektronová mikroskopie

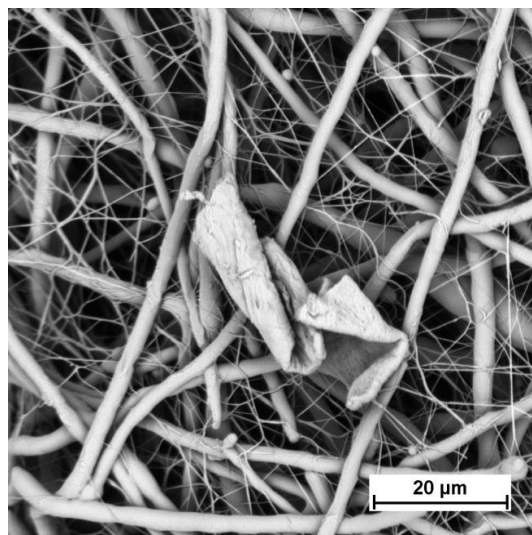
Snímky elektronového mikroskopu v druhý den kultivace na obr. 13 prokazují přítomnost buněk na povrchu vyrobených vrstev. Snímky pořízené sedmý den kultivace na obr. 14, ukazují větší proliferaci buněk na povrchu u vzorku, kde byly buňky nasazeny na povrch vrstvy. Tyto snímky však ukazují jen velmi malou plochu vzorku, takže příliš nevypovídají o rozmístění buněk po celém povrchu vzorku.



(a)

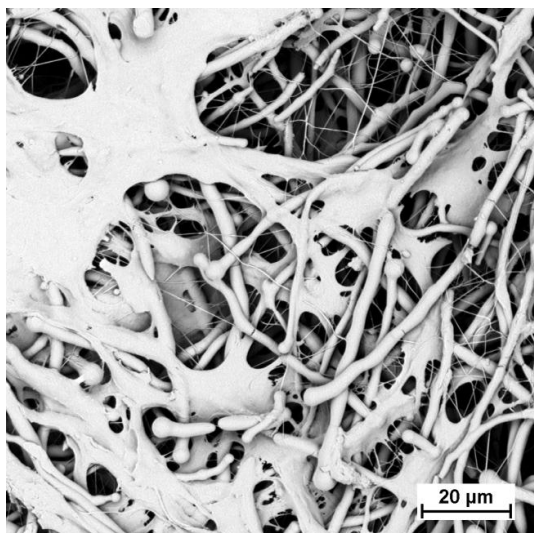


(b)

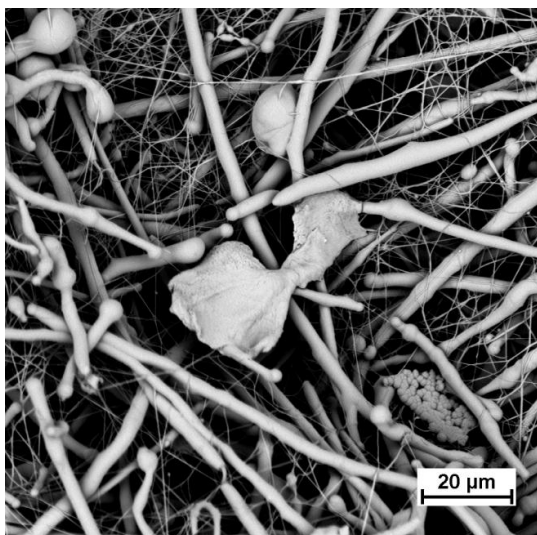


(c)

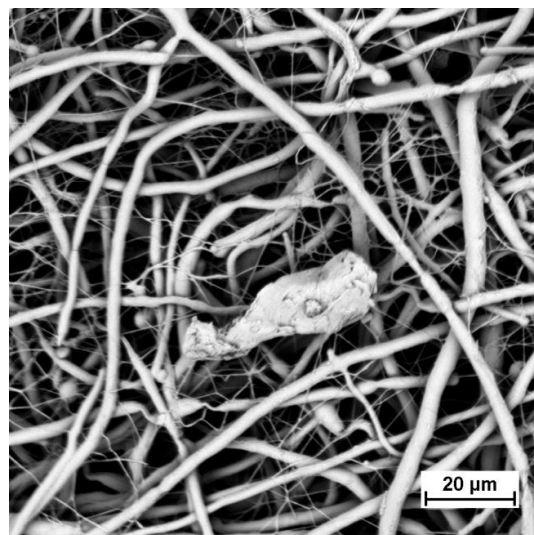
Obrázek 13: Snímky z elektronového mikroskopu 2. den kultivace: (a) Proliferace buněk z povrchu, (b) Inkorporace buněk Pasteurovou pipetou, (c) Inkorporace buněk mechanickým rozprašovačem.



(a)



(b)



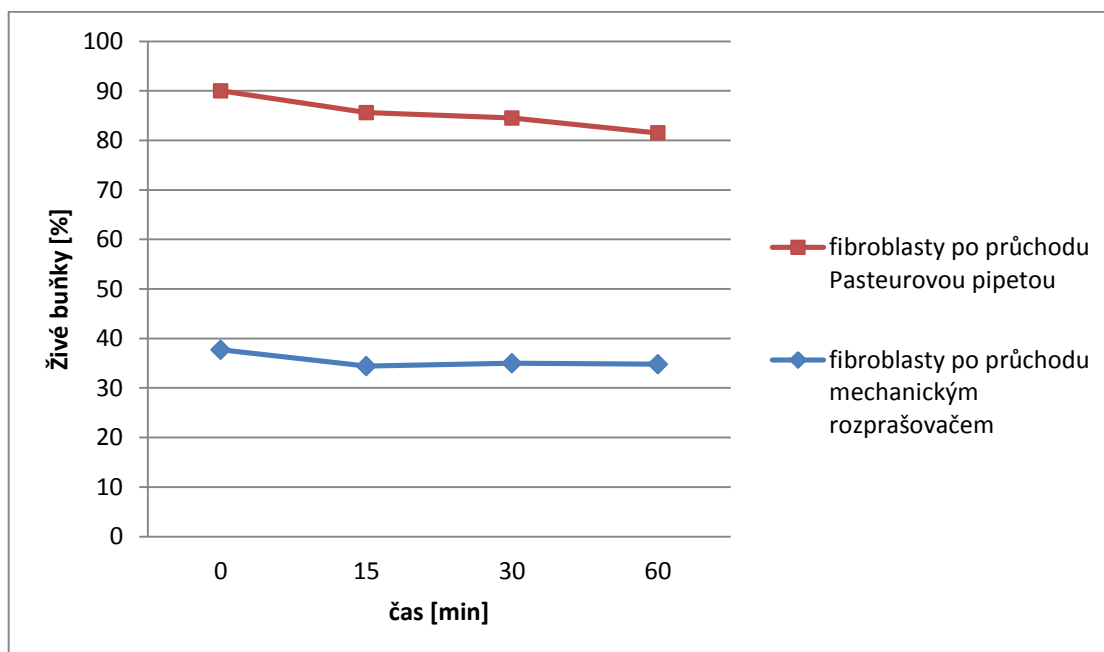
(c)

Obrázek 14: Snímky z elektronového mikroskopu 7. den kultivace: (a) Proliferace buněk z povrchu, (b) Inkorporace buněk Pasteurovou pipetou, (c) Inkorporace buněk mechanickým rozprašovačem.

4.1.2 Vliv použitých metod na viabilitu fibroblastů

Průchod buněk Pasteurovou pipetou a mechanickým rozprašovačem může mít za následek porušení buněčné membrány a následné odumření buňky. Z tohoto důvodu byl proveden experiment, kdy byla buněčná suspenze vstříkována mechanickým rozprašovačem, nebo vkapávána Pasteurovou pipetou do Petriho misky a následně sledována viabilita buněk. Viabilita buněk byla pozorována přímou metodou a to barvením mrtvých buněk Trypanovou modří (popsáno v 3.5). K vyhodnocení procenta

živých a mrtvých buněk byla použita Bürkerova komůrka. Viabilita buněk byla sledována bezprostředně po použití dané metody a následně po 15, 30 a 60 minutách. Na obr. 15 je graficky zpracováno vyhodnocení vlivu použitých metod na viabilitu fibroblastů. Viabilita fibroblastů po průchodu mechanickým rozprašovačem byla výrazně nižší než při průchodu buněk Pasteurovou pipetou.



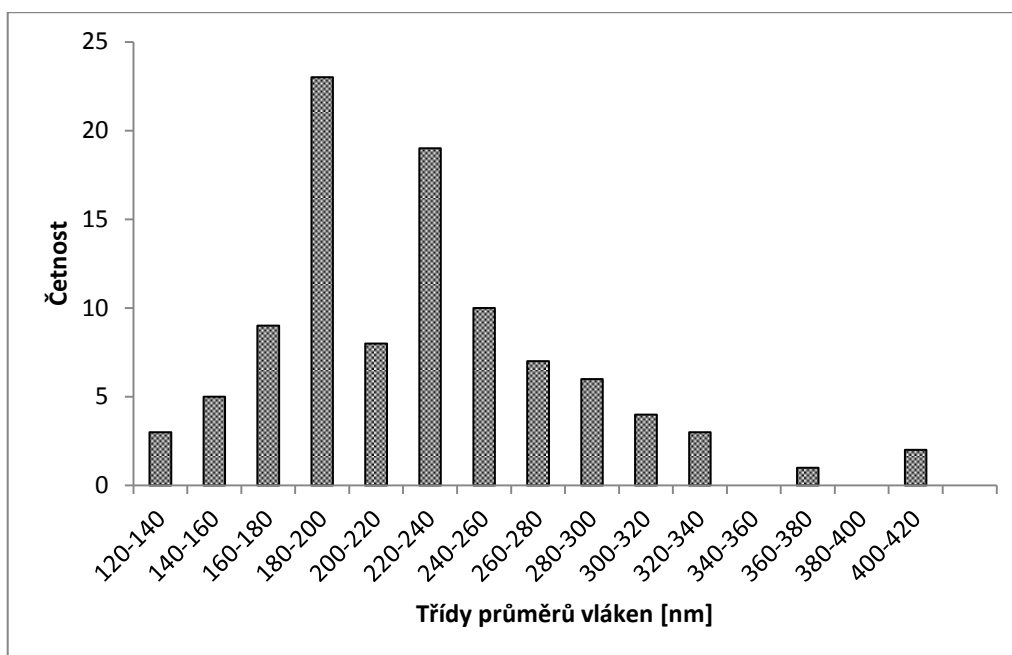
Obrázek 15: Vliv použitých metod na viabilitu fibroblastů.

4.1.3 Struktura vyrobených vrstev

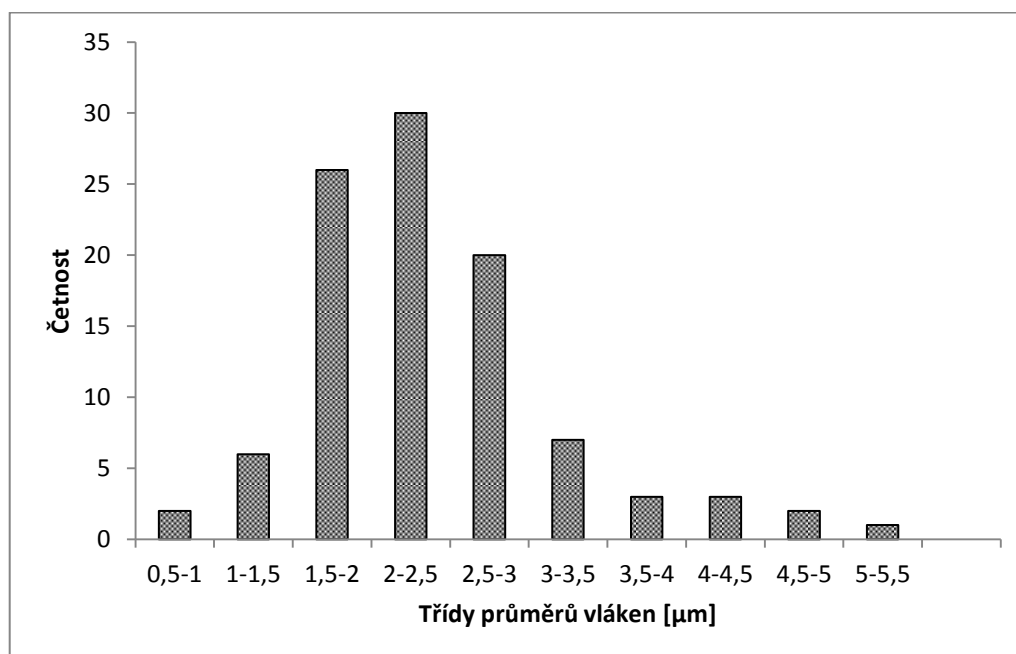
Vyrobené buněčné nosiče se skládaly převážně z nanovláken, avšak obsahovaly i mikroválka. Průměrné jemnosti nanovláken a mikrovláken jsou zaznamenány v tabulce 4. Histogramy znázorňující distribuci dat, jsou zobrazeny na obr. 16 a 17.

Tabulka 4: Vyhodnocení průměrů vláken.

Typ vláken	Průměr vláken [nm];[μm]	Směrodatná odchylka	Minimum	Maximum	Median
Nanovláka	225,16 nm	56,81	120,37	414,03	220,48
Mikrovláka	2,36 μm	0,81	0,82	5,34	2,195



Obrázek 16: Histogram průměrů nanovláken.



Obrázek 17: Histogram průměrů mikrovláken.

4.2 Inkorporace trombocytů do nanovláknenných vrstev

Cílem tohoto experimentu bylo zvýšit proliferaci fibroblastů do nanovláknenných vrstev přidáním trombocytů dovnitř nanovláknenné vrstvy. Alternativou k tomuto pokusu je smáčení scaffoldů v suspenzi s trombocyty. V tomto případě byly trombocyty vstříkovány do nanovláknenné vrstvy přímo při procesu elektrostatického zvlákňování. Trombocyty nejsou poté pouze na povrchu materiálu, jako je tomu u smáčení, ale v celém objemu vrstvy, což může přispět k proliferaci buněčné populace dovnitř scaffoldu.

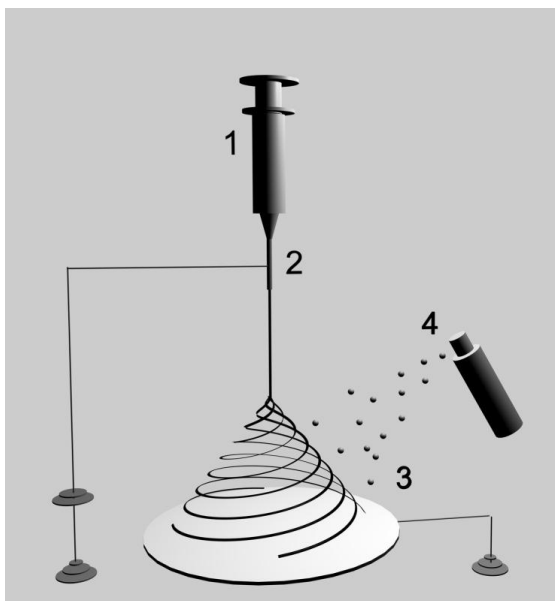
Pro elektrostatické zvlákňování byl jako polymer použit polykaprolakton, příprava viz 3.1.

Pro experiment byly použity lidské fibroblasty z 1. pasáže (NHDF - Normal Human Dermal Fibroblasts, Lonza), které byly kultivovány ve Fibroblast Basal Mediu (složení viz 3.2). Buněčná suspenze byla připravena v koncentraci 5×10^5 buněk/ml.

Koncentrát trombocytů byl připraven Transfúzním oddělením Krajské nemocnice v Liberci o koncentraci 626×10^6 /ml.

Proces elektrostatického zvlákňování:

Proces elektrostatického zvlákňování probíhal uvnitř laminárního boxu z důvodu udržení sterilního prostředí během celého pokusu. Uspořádání aparátu pro zvlákňování je znázorněno na obr. 18. Polymer ve stříkačce (1) vlivem gravitační síly kapal jehlou, která byla připojena ke zdroji vysokého napětí (2). Nanovláknenná vrstva se vytvářela na uzemněný kolektor (3). V pravidelných intervalech (po 5 minutách) byla do vytvářející se nanovláknenné vrstvy vstříkována suspenze s trombocyty pomocí mechanického rozprašovače (4). Celkem bylo na vrstvu použito 7 ml suspenze s trombocyty, tzn. přibližně 4×10^9 trombocytů.



Obrázek 18: Elektrostatické zvlákňování: (1) stříkačka s polymerem, (2) zdroj vysokého napětí, (3) uzemněný kolektor, mechanický rozprašovač.

Vzdálenost elektrody od uzemněného kolektoru byla 12 cm. Napětí při zvlákňování bylo 16 kV. Na výrobu jedné vrstvy bylo využito 5.5 ml PCL. Teplota v laminárním boxu byla 23.6°C, relativní vlhkost vzduchu 21%.

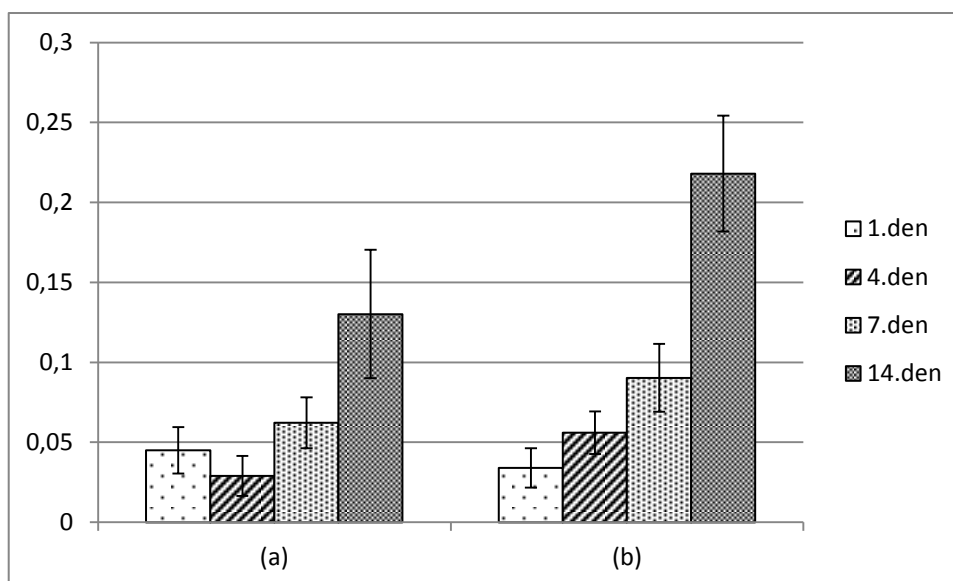
Pro porovnání proliferace fibroblastů v takto vytvořené nanovlákně vrstvě byla vyrobena vrstva za stejných podmínek, ale bez trombocytů.

Obě vrstvy byly následně nastříhány na vzorky odpovídající rozměrům 96-jamkové testovací destičky a ponořeny do kultivačního média s buněčnou suspenzí fibroblastů. Počet buněk na jednu jamku byl 5×10^4 .

Následovala inkubace po dobu 14 dnů v termostatu za stálé teploty 37°C v atmosféře 5% CO₂. Hodnocení proliferace fibroblastů bylo provedeno 1., 4., 7. a 14. den.

4.2.1 Vyhodnocení metody

Vyhodnocování proliferace fibroblastů bylo provedeno metodou MTT testu. Výsledky jsou zobrazeny v grafu na obr. 19 a zaznamenány v tabulce 5.



Obrázek 19: Výsledky buněčné proliferace 1., 4., 7. a 14. den: (a) PCL vrstva bez inkorporovaných trombocytů, (b) PCL vrstva s inkorporovanými trombocyty.

Tabulka 5: Výsledky MTT testu: (a) PCL s fibroblasty, (b) vrstva PCL s fibroblasty a inkorporovanými trombocyty.

Den	Metoda	Průměrná hodnota absorpance	Směrodatná odchylka
1	(a)	0,045	0,015
	(b)	0,034	0,012
4	(a)	0,029	0,013
	(b)	0,056	0,013
7	(a)	0,062	0,016
	(b)	0,090	0,021
14	(a)	0,130	0,048
	(b)	0,218	0,036

Statistickým vyhodnocením metodou *ANOVA* (testování rozdílu více středních hodnot) v prostředí programu *MATLAB* bylo zjištěno, že střední hodnoty výše zmíněných metod se na hladině významnosti testu $\alpha = 0,05$ v první, čtvrtý a sedmý den kultivace významně neliší. Avšak čtrnáctý den kultivace se střední hodnoty metod (a) a (b) významně liší.

V tabulce 6 je uveden počet buněk, který odpovídá hodnotě absorbance pro každou metodu v 1., 4., 7. a 14. den kultivace. Přepočet byl proveden dle rovnice lineární regrese na obr. 7 v podkapitole 3.4.

Tabulka 6: Množství buněk odpovídající hodnotě absorbance: (a) vrstva PCL s fibroblasty, (b) vrstva PCL s fibroblasty a inkorporovanými trombocyty.

Den	Metoda	Hodnota absorbance	Počet buněk
1	(a)	0,045	$1,4 \times 10^3$
	(b)	0,034	$0,8 \times 10^3$
4	(a)	0,029	$0,6 \times 10^3$
	(b)	0,056	$1,9 \times 10^3$
7	(a)	0,062	$2,3 \times 10^3$
	(b)	0,090	$4,1 \times 10^3$
14	(a)	0,130	$5,7 \times 10^3$
	(b)	0,218	$10,05 \times 10^3$

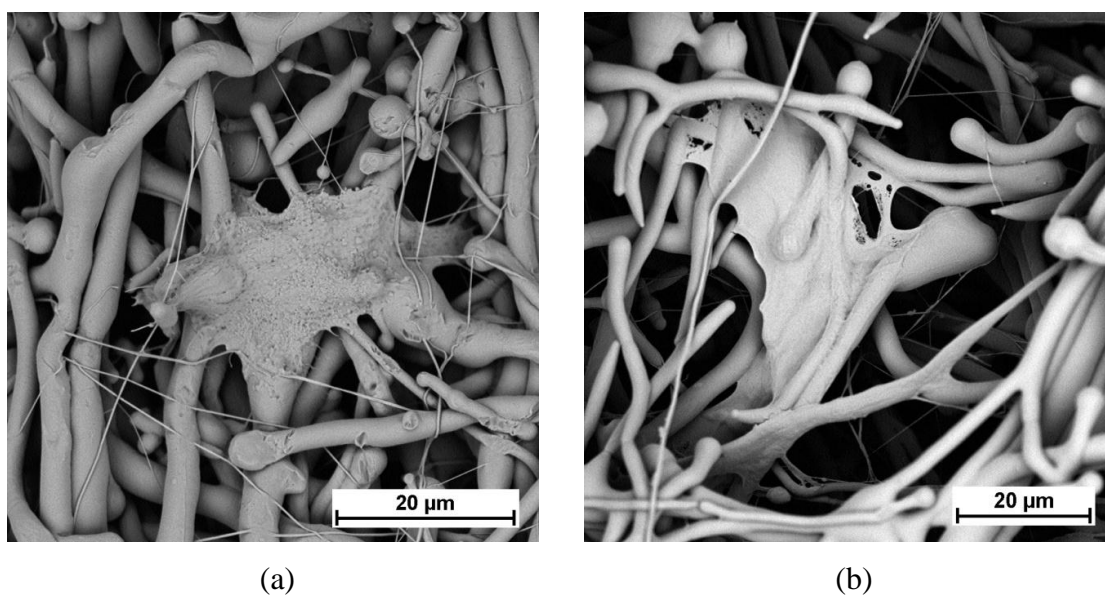
Vzhledem k tomu, že trombocyty taktéž metabolizují MTT na formazanové krystaly a ovlivňují tak výsledky MTT testů, byly od vyrobených vzorků odečítány tzv. kontrolní vzorky. Kontrolními vzorky byly samotné PCL vrstvy bez buněčné populace, které byly odečítány od vzorků s fibroblasty (bez inkorporovaných trombocytů). Dalšími kontrolními vzorky byly PCL vrstvy s inkorporovanými trombocyty, které byly odečítány od vzorků s fibroblasty a inkorporovanými trombocyty. Přítomnost trombocytů potvrdily výsledky MTT testu kontrolních vzorků v tabulce 7. Z této tabulky je vidět, že do 7 dnů inkubace jsou vyšší hodnoty absorbance u kontrol obsahujících trombocyty. Vzhledem k tomu, že životnost trombocytů je přibližně 7 dní, byly hodnoty obou kontrolních vzorků po 14-ti dnech srovnatelné.

Tabulka 7: Hodnoty MTT testu pro referenční vzorky.

Doba kultivace	PCL	PCL s trombocyty
1	0,0245	0,041
4	0,0543	0,062
7	0,0355	0,041
14	0,0443	0,036

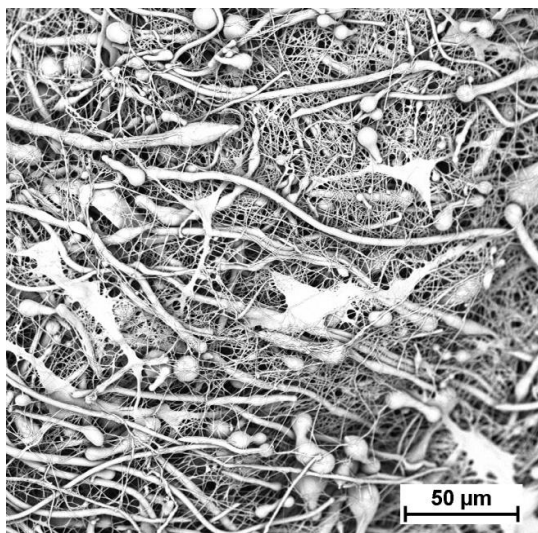
Elektronová mikroskopie

Snímky z elektronového mikroskopu na obr. 20 ukazují jednotlivé buňky na vyrobených vrstvách po prvním dni kultivace.

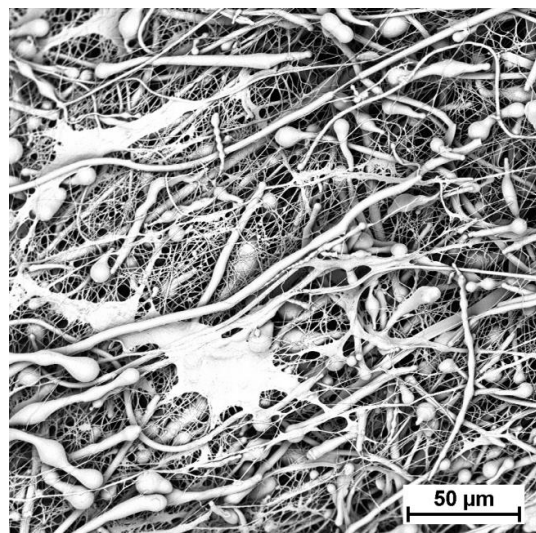


Obrázek 20: Snímky z elektronového mikroskopu první den kultivace: (a) PCL vrstva bez inkorporovaných trombocytů, (b) PCL vrstva s inkorporovanými trombocyty.

Po sedmi dnech kultivace bylo na povrchu obou vzorků pozorováno větší množství buněk (obr. 21).



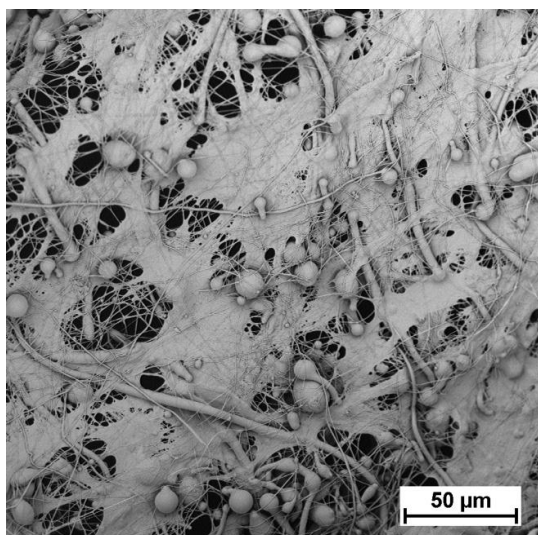
(a)



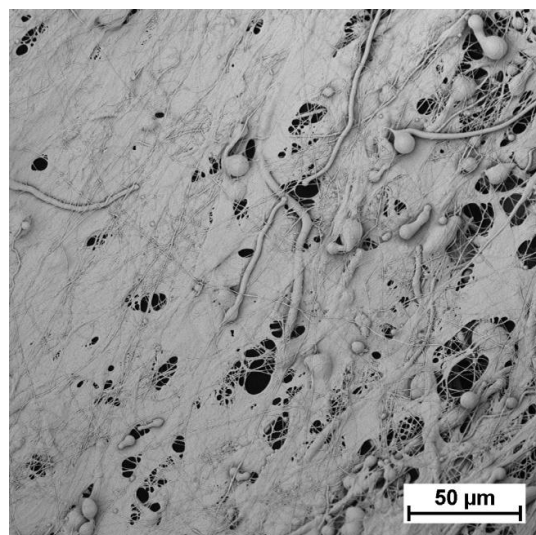
(b)

Obrázek 21: Snímky z elektronového mikroskopu sedmý den kultivace: (a) PCL vrstva bez inkorporovaných trombocytů, (b) PCL vrstva s inkorporovanými trombocyty.

Na snímcích ze čtrnáctého dne kultivace na obr. 22 byly sledovány části povrchu vzorku pokryté souvislým filmem buněčné kultury.



(a)

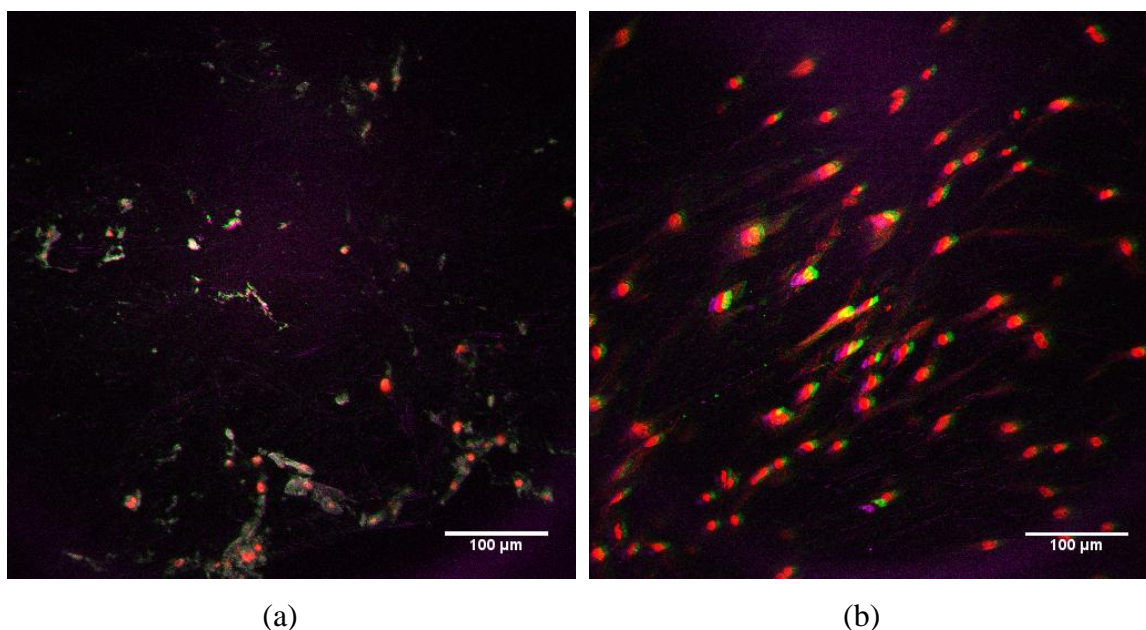


(b)

Obrázek 22: Snímky z elektronového mikroskopu čtrnáctý den kultivace: (a) PCL vrstva bez inkorporovaných trombocytů, (b) PCL vrstva s inkorporovanými trombocyty.

Konfokální mikroskop

Použitím konfokálního mikroskopu (viz 3.8) bylo možné sledovat rozmístění buněk na větší ploše vzorku. Snímky na obr. 23 zobrazují vzorky po 14-ti dnech kultivace. Jádra buněk vyzařující červeně byla ve větším množství pozorována u vrstvy s inkorporovanými trombocyty, viz obr. 23(b). Trombocyty na sebe sice váží Propidium jodid stejně jako fibroblasty, ale jen velmi slabě. Navíc jsou trombocyty až 10-krát menší než fibroblasty. Snímek, kde byly do vrstvy inkorporovány trombocyty, zobrazuje tedy pouze jádra fibroblastů.



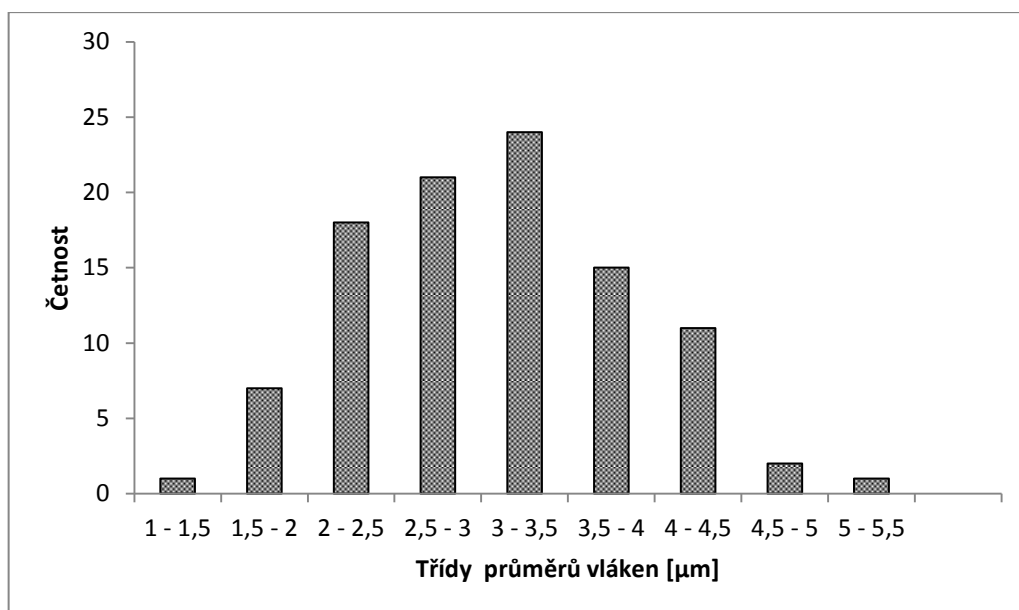
Obrázek 23: Snímky z konfokálního mikroskopu 14.den kultivace: (a) PCL vrstva bez inkorporovaných trombocytů, (b) PCL vrstva s inkorporovanými trombocyty. Snímky byly pořízeny Ing. Kateřinou Ročkovou.

4.2.2 Struktura vyrobených vrstev

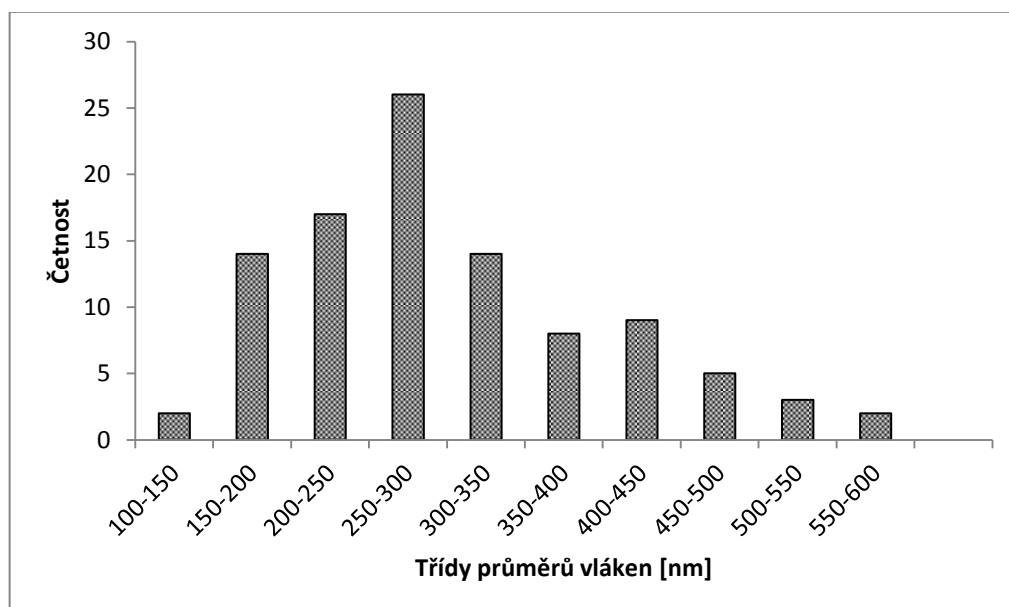
Vyrobené buněčné nosiče se skládaly převážně z nanovláken, avšak obsahovaly i mikrovlákná. Průměrné jemnosti nanovláken a mikrovláken jsou zaznamenány v tabulce 8. Histogram, znázorňující distribuci průměrů mikrovláken, je zobrazen na obr. 24. Na obr. 25 je znázorněn histogram průměrů nanovláken.

Tabulka 8: Vyhodnocení průměrů vláken.

Typ vláken	Průměr vláken[nm];[μm]	Směrodatná odchylka	Minimum	Maximum	Median
Nanovlákná	300,7 nm	99,93	120,5	576,02	286,81
Mikrovlákná	3,07 μm	0,78	1,19	5,25	3,05



Obrázek 24: Histogram průměrů mikrovláken.



Obrázek 25: Histogram průměrů nanovláken.

5. Diskuze výsledků

Předmětem diplomové práce je inkorporace fibroblastů do nanovláknenného buněčného nosiče. Inkorporace fibroblastů do nanovláknenných vrstev byla prováděna dvěma způsoby.

Prvním způsobem byla inkorporace fibroblastů přímo do vytvářející se nanovláknenné vrstvy metodou elektrostatického zvlákňování. Během tohoto procesu byla buněčná suspenze v pravidelných intervalech vkapávána Pasteurovou pipetou nebo vstřikována mechanickým rozprašovačem do vytvářené nanovláknenné struktury. Pro porovnání těchto metod s běžně používaným způsobem osidlování buněčných nosičů byla vyrobena nanovláknenná vrstva, u které byla sledována proliferace buněk z povrchu.

MTT test, který nepřímým způsobem stanovuje proliferaci buněk, prokázal v první řadě přítomnost buněk ve všech vyrobených nanovláknenných vrstvách. Buněčná proliferace byla sledována druhý a sedmý den kultivace buněčných nosičů. Z hodnot absorbance byl sestaven graf, který prokazuje růst buněčné kultury. Proliferace buněk nasazených na povrch nanovláknenné vrstvy byla vyšší, než u ostatních metod. Buňky inkorporované Pasteurovou pipetou proliferovaly v nanovláknenné vrstvě pomaleji, ale jejich počet v sedmý den kultivace vykazoval nejvyšší hodnotu absorbance, tedy i nejvyšší počet buněk. Statistickým vyhodnocením metodou ANOVA (testování rozdílu více středních hodnot) bylo zjištěno, že střední hodnoty absorbance dvou výše zmíněných metod se v sedmý den kultivace na hladině významnosti testu $\alpha = 0,05$ významně neliší.

Buněčná proliferace u vzorků vyrobených metodou Inkorporace fibroblastů mechanickým rozprašovačem byla méně progresivní než u předchozích metod. Druhý den kultivace se střední hodnota absorbance sice od první metody významně nelišila, avšak v sedmý den kultivace byla hodnota absorbance ze všech použitých metod nejnižší. Ze statistického vyhodnocení vyplývá, že střední hodnota absorbance této třetí metody se v sedmý den kultivace výrazně liší od středních hodnot absorbance předchozích dvou metod.

V návaznosti na tuto skutečnost byl zjišťován vliv jednotlivých metod na viabilitu buněk. Průchod mechanickým rozprašovačem měl na buňky ničivější dopad než průchod Pasteurovou pipetou. Toto zjištění vede k domněnce, že nižší proliferace buněk může být způsobena průchodem buněk mechanickým rozprašovačem.

Snímky z fluorescenčního mikroskopu prokázaly rovnoměrnější rozmístění buněk v nanovlákněných vrstvách u metod, kde byly fibroblasty inkorporovány dovnitř nanovlákněných struktur.

Na snímcích z elektronového mikroskopu byl pozorován povrch vzorků. U vzorků, kde byly fibroblasty nasazovány na povrch nanovlákněné vrstvy, se po sedmém dni kultivace objevovaly místa konfluentně porostlá buněčnou kulturou. Naopak u vzorků vyrobených metodami inkorporace do nanovlákněných struktur byly na povrchu vrstev pozorovány pouze jednotlivé buňky. Ty byly s největší pravděpodobností vneseny na povrch struktury při manipulaci se vzorkem (např. při vykrajování vzorků).

Druhou metodou pro zvýšení proliferace fibroblastů dovnitř 3D struktury buněčného nosiče byla inkorporace trombocytů do nanovlákněné vrstvy. Suspenze trombocytů byla vstřikována mechanickým rozprašovačem do procesu elektrostatického zvlákňování. Následně byla sledována proliferace fibroblastů do takto vytvořené vrstvy. Za stejných podmínek byla vyrobena nanovlákněná vrstva bez inkorporovaných trombocytů, která sloužila k porovnání proliferace fibroblastů.

Vzhledem k tomu, že byly pro toto testování použity lidské fibroblasty, u kterých je buněčná proliferace pomalejší, byly vzorky kultivovány 14 dní.

Z hodnot MTT testu vyplývá, že proliferace fibroblastů byla vyšší u vzorků s inkorporovanými trombocyty. Testováním rozdílů středních hodnot bylo zjištěno, že střední hodnoty absorbance výše zmíněných metod se na hladině spolehlivosti $\alpha = 0,05$ první, čtvrtý a sedmý den významně nelišily. Poslední den kultivace se střední hodnoty absorbance již významně lišily.

Konfokální mikroskopií nebylo možné identifikovat v nanovlákněné struktuře trombocyty. Snímky však ukazují vyšší množství buněčných jader fibroblastů u vzorků s inkorporovanými trombocyty.

Povrch vzorků obou metod, který byl pozorován elektronovým mikroskopem, byl po 14. dnech kultivace na mnoha místech konfluentně pokryt buňkami.

Vrstvy vyrobené popsány metodami obsahovaly vlákna o průměrech nanometrů i mikrometrů. Zastoupení nanovláken bylo výrazně vyšší než zastoupení mikrovláken. Průměry obou typů vláken jsou názorně zpracovány v histogramech.

6. Závěr

Předmětem diplomové práce je příprava nanovláknenných struktur pro kultivaci fibroblastů. Byly navrženy a experimentálně ověřeny dva způsoby inkorporace fibroblastů do nanovláknenných vrstev.

Prvním způsobem byla inkorporace fibroblastů přímo do vytvářející se nanovláknenné vrstvy metodou elektrostatického zvlákňování. Metodami inkorporace buněk do nanovláknenných struktur pomocí Pasteurovy pipety a mechanického rozprašovače bylo možné fibroblasty kultivovat v celém objemu buněčného nosiče. Po sedmi dnech kultivace nebyl zjištěn významný rozdíl v proliferaci buněk nasazených na povrch nanovláknenné vrstvy a buněk inkorporovaných Pasteurovou pipetou. Proliferace buněk inkorporovaných do nanovláknenných vrstev mechanickým rozprašovačem byla výrazně nižší. Průchod rozprašovací tryskou zřejmě buňky mechanicky poškodil. Toto poškození může být jednou z příčin snížené proliferace buněk.

Druhým způsobem jak zvýšit proliferaci fibroblastů do nanovláknenných struktur bylo použití růstových faktorů obsažených v trombocytech, které zvyšují buněčnou proliferaci. Vstříkováním suspenze trombocytů do vytvářené nanovláknenné struktury bylo možné inkorporovat růstové faktory do celého objemu buněčného nosiče. Proliferace fibroblastů v nanovláknenných vrstvách obsahujících trombocyty byla po 14. dnech kultivace významně vyšší než v nanovláknenných vrstvách bez inkorporovaných trombocytů.

Postup, kdy jsou buňky inkorporovány přímo do vytvářené nanovláknenné struktury přináší možnost vytvářet rovnoměrně osídlené buněčné nosiče. Důležitá je volba metody inkorporace buněk, která by neměla mít vliv na viabilitu buněk. Struktura buněčného nosiče by měla obsahovat dostatek pórů pro distribuci živin a proliferaci buněk do celého objemu.

Trombocyty inkorporované do nanovláknenných struktur vytváří pro fibroblasty vhodné prostředí k proliferaci. Vzhledem ke své velikosti, mohou být trombocyty do nanovláknenných vrstev inkorporovány mechanickým rozprašovačem. Na rozdíl od metody, kdy jsou do nanovláknenných struktur inkorporovány fibroblasty, metoda inkorporace trombocytů snižuje riziko poškození fibroblastů.

7. Literatura

- [1] CUDLÍNOVÁ, Marcela. Vývoj a biologické testování nanovláknenných vrstev. Liberec, 2011. Bakalářská práce. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce prof. David Lukáš.
- [2] VAN AALST, John A., Courtney R. REED, Li HAN, Tony ANDRADY, Michael HROMADKA, Susan BERNACKI, Kamalkumar KOLAPPA, James B. COLLINS a Elizabeth G. LOBOA. Cellular Incorporation Into Electrospun Nanofibers. *Annals of Plastic Surgery*. 2008, vol. 60, issue 5, s. 577-583. DOI: 10.1097/SAP.0b013e318168db3e.
- [3] FATIH CANBOLAT, Mehmet, Christina TANG, Susan H. BERNACKI, Behnam POURDEYHIMI a Saad KHAN. Mammalian Cell Viability in Electrospun Composite Nanofiber Structures. *Macromolecular Bioscience*. 2011-10-10, vol. 11, issue 10, s. 1346-1356. DOI: 10.1002/mabi.201100108.
- [4] WEBSTER, Thomas J, Justin SEIL, Bikram BASU a Dharendra KATTI. Spray deposition of live cells throughout the electrospinning process produces nanofibrous three-dimensional tissue scaffolds. *International Journal of Nanomedicine*. s. 1095-. DOI: 10.2147/IJN.S18803.
- [5] SLAPNÍČKA, Jan. Vliv aktivované a neaktivované plazmy bohaté na trombocyty (PRP) na proliferaci lidských osteoblastů a fibroblastů in vitro. Brno, 2009. Dizertační práce. Masarykova univerzita.
- [6] LUKÁŠ, David, et al. Lékařské textilie : 2. díl. Praha : Asociace inovačního podnikání, 2008. 248 s.
- [7] EXTRACELULÁRNÍ MATRIX, BUNĚČNÉ ADHEZE A SPOJE. 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy [online]. 2010 [cit. 2013-05-14]. Dostupné z: http://www.lf3.cuni.cz/opencms/export/sites/www.lf3.cuni.cz/cs/pracoviste/molekularni-biologie/vyuka/studijnimaterialy/CVSE1M0001/prednasky/20_

- [8] Velký lékařský slovník. Velký lékařský slovník [online]. 2008 [cit. 2012-12-15]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/>
- [9] BAČÁKOVÁ, Lucie. FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR, v. v. i. Tkáňové inženýrství náhrad cév a srdečních chlopní. Praha, 2012.
- [10] RŮŽIČKOVÁ, Jana. *Elektrostatické zvlákňování nanovláken*. Liberec : Technická univerzita v Liberci, 2006. 54 s.
- [11] LUKÁŠ, D., A. SARKAR, L. MARTINOVÁ, K. VODSED'ÁLKOVÁ, D. LUBASOVÁ, J. CHALOUPEK, P. POKORNÝ, MIKEŠ, J. CHVOJKA a M. KOMÁREK. Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century). Textile Progress. 2009-05-29, roč. 41, č. 2, s. 59-140. ISSN 0040-5167. DOI: 10.1080/00405160902904641
- [12] VEJRAŽKA, Martin. Buněčné kultury. Praha, 2007. 2 s. Synopse přednášky. Univerzita Karlova v Praze.
- [13] ČECH, Svatopluk. Přehled obecné histologie. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Brno 2005.
- [14] Vazivová tkáň - vazivo. Patobiomechanika & Patokineziologie [online]. 1999 [cit.2013-05-17].Dostupné z:http://biomech.ftvs.cuni.cz/pbpk/kompendium/anatomie/tkane_pojive_vazivo.php
- [15] Fibroblast. Rejuvenal healthy aging [online]. 2007 [cit. 2013-05-17]. Dostupné z: <http://www.rejuvenal.info/Terminology/fibroblast-collagen-production-skinhealth.html>

- [16] SAMCOVÁ, Eva a Petr TŮMA. Pojivová tkáň: Extracelulární matrix (ECM). In: 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy [online]. 2005 [cit. 2013-05-17]. Dostupné z: http://www.lf3.cuni.cz/opencms/export/sites/www.lf3.cuni.cz/cs/pracoviste/chemie/vyuka/studijni-materialy/CVSE1M0001/prednasky/es_28_extracelulxrnx_matrix.pdf
- [17] FREI R., BIOSCA F.E., M. HANDL a T. TRČ. Funkce růstových faktorů v lidském organismu a jejich využití v medicíně, zejména v ortopedii a traumatologii. Acta Chirurgiae orthopaedicae et Traumatologiae čechoslovaca. 2008, č. 75. Dostupné z: http://www.achot.cz/dwnld/0804_247.pdf
- [18] MLEZIVA, Josef. Polymery - výroba, struktura, vlastnosti a použití. 1. vyd. Praha: Sobotáles, 1993, 525 s. ISBN 80-901-5704-1.
- [19] FRESHNEY, R. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6th ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell, c2010, xxxi, 732 p., [28] p. of plates. ISBN 04-705-2812-5.
- [20] Hodnocení cytotoxicity in vitro na modelu lidské buněčné linie HepG2. In: Buněčná biologie II [online]. 2010 [cit. 2013-05-18]. Dostupné z: www.genetika.upol.cz/download.aspx?id=207&t=0
- [21] MTT test. Laboratoř experimentální medicíny [online]. 2010 [cit. 2013-05-18]. Dostupné z: <http://lem.ocol.cz/cs/info/mtt-test>
- [22] Přírodovědecká fakulta univerzity Palackého v Olomouci: Katedra botaniky. Konfokální mikroskopie [online]. [cit. 2012-05-15]. Dostupné z: <http://www.botanika.upol.cz/atlas/confmicro/index.php>